

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-27189

(43)公開日 平成8年(1996)1月30日

(51)Int.Cl.
C07K 14/52
A61K 38/09
C12N 1/21
15/09

識別記号 月内整理番号
8318-4H
ABH
AED
8823-4B

FD

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数22 FD (全17頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-184162

(71)出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(22)出願日 平成6年(1994)7月14日

(72)発明者 岡村 春樹

大阪府茨木市中穂積2丁目12番32号

(72)発明者 谷本 忠雄

岡山県岡山市山崎3丁12番地の88

(72)発明者 鳥越 角二

岡山県倉敷市藤原町1343番地の5

(72)発明者 栗本 雅司

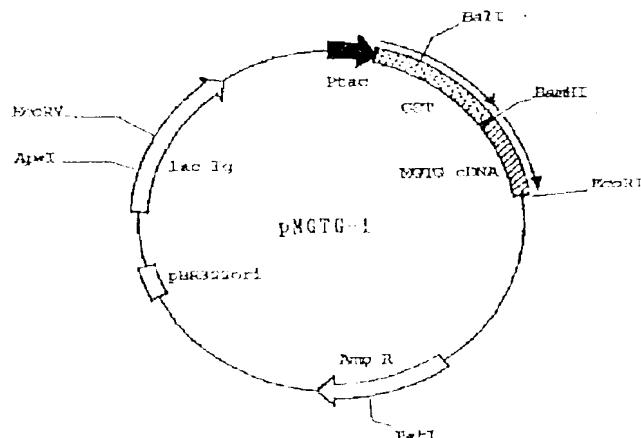
岡山県岡山市学園町2丁目7番25号

(54)【発明の名称】インターフェロン- γ の産生を誘導する蛋白質

(57)【要約】

【目的】免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質、その蛋白質をコードするDNA、そのDNAを含む組換えDNA及び形質転換体並びにその形質転換体を用いる蛋白質の製造方法を提供する。

【構成】特定の理化学的性質を有する蛋白質と、その蛋白質をコードするDNAと、そのDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAと、その組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体と、その形質転換体を培養培地で培養し、產生した蛋白質を培養物から採取してなる蛋白質の製造方法を要旨とする。



【従来の技術】IFN- γ は、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有する蛋白質として知られ、抗原やマウントによる刺激を受けた免疫担当細胞が産生すると云われている。これら生物作用ゆえに、IFN- γ はその発見当初より抗腫瘍剤としての実用化が鶴首され、現在では肺腫瘍を中心とする悪性腫瘍一般の治療剤として精力的に臨床試験が進められている。現在入手し得るIFN- γ は免疫担当細胞が産生する天然型IFN- γ と、免疫担当細胞から採取したIFN- γ をコートするDNAを大腸菌に導入してなる形質転換体が産生する組換え型IFN- γ に大別され、上記臨床試験においては、これらのうちのいずれかが、外来IFN- γ と並んで投与されている。

【0003】このうち、天然型IFN- γ は、通常、培養活性化した免疫担当細胞をIFN- γ 誘導剤を含む培養培地で培養し、その培養物を精製することにより製造される。この方法では、IFN- γ 誘導剤の種類がIFN- γ の産生量や精製のしやすさ、さらには、製品の安全性等に多大の影響を及ぼすと云われており、通常、コレカナルギン、ヒトアズキレクチン、アリカリカゼイホウカルチナ、ヒトリトキシト、リボヌク糖などのマウス細胞を用いられる。一方でながら、これらも既に、これまで分子に多様性があり、給添や精製方法に依って品質が変動する、評議の一定したIFN- γ 誘導剤を産生量大手に挙げての問題もある。そのため、上記物質のみで生体に投与するは頗著な副作用を示したり、物質によっては毒性を示す事もあり、生体に直射はしないIFN- γ を育生を誘導するのが急務である。

【0004】

【従来の技術】従来のIFN- γ は、この目的には、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を増加させる形質を提供することにある。

【0005】この発明の目的は、異なる蛋白質を介してIFN- γ を提供することにある。

【0006】この発明の目的は、異なるDNAと日本特許公報に記載するものと並んである組換えIFN- γ を提供することにある。

【0007】この発明の目的は、新たに組換えIFN- γ を産生する形質転換体を提供することである。

【0008】この発明の目的は、組換えIFN- γ を産生する形質の要法を提供することである。

【0009】この発明の目的は、この発明は、上記各の異なる、他の理化学的性質を有する蛋白質により解説されるものである。

【1. 1. 1. 量】

SDS-PAGEアセチルアミドゲル電気泳動法又はゲル過濾法で測定すると、分子量19,000~16,000ノットンを示す。

(2) 等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、4.8~4.0に等電点を示す。

(3) 部分アミノ酸配列

配列表における番号1及び2に示す部分アミノ酸配列を有する。

(4) 生物作用

免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する。

【0010】この発明は、上記第一の課題を、斯かる蛋白質をコートするDNAにより解決するものである。

【0011】この発明は、上記第二の課題を、門脇由仁氏による複製可能な組換えDNAにより解決するものである。

【0012】この発明は、上記第四の課題を、斯かるDNAと自律複製可能なクターを含むてなる複製可能な組換えDNAにより解決するものである。

【0013】この発明は、上記第五の課題を、当該蛋白質を産生し得る形質転換体を保育培地で培養し、産生した蛋白質を培養物から採取してなら蛋白質の製造方法により解決するものである。

【0014】

【作用】この発明の蛋白質は、既述したように、日本公報に記載された、持持の理化学的性質を有する、免疫担当細胞に作用させると、IFN- γ の産生を誘導する。

【0015】この発明のDNAは、自律複製可能な組換えクターに持りて組換えDNAとし、これを保育培地で培養して、当該蛋白質を産生し得る細胞を、當該蛋白質を産生させるために導入して形質転換体とすることにあり、当該蛋白質の産生を発現する。

【0016】この発明の複製可能なDNAは、本発明の蛋白質を産生しないそれとも、蛋白質は増殖されないもので、それを細胞に導入して形質転換体とすることにあり、当該蛋白質の産生を発現する。

【0017】この発明の形質転換体は、著者名と、当該蛋白質を産生する。

【0018】斯かる形質転換体を用いた発明の製造方法にしたがって培養すれば、期望量の蛋白質は目的的容易に得られる。

【0019】以下、実施例、実験例等に基づきこの発明を説明する。この発明は、免疫担当細胞におけるIFN- γ の産生を説明する新規な蛋白質に基づいており、本発明者が、哺乳類由来の細胞で産生するサルトカゼイホウカルチナを研究して来たところ、マウス細胞中にIFN- γ の産生を説明する従来未記載全く新規な蛋白質が存在することを見出した。カラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの物質を単離し、その性質・性状を調べたところ、この本質は重

質であり、次ののような理化学的性質を有するものであることが説明された。

5

11 1863

S-PDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濃過法で測定すると、分子量1.9, 0.00±5, 0.00ダルトと表示す。

(2) $\frac{d}{dt} \mathcal{H}_0$

クロマトフォーカシング法で測定すると、4, 8, 10に等量点を示す。

(3) 部分文字的排列

配列表における配列番号1及び2に示す部分アミノ酸配列を有する。

（二）民族作用

免疫担当細胞において IFN- γ の產生を誘導する。

【0020】次に、これら理化学的性質を解明するに到った一連の実験について説明する。

[0 0 2 1]

【実験例1】精製蛋白質の調製】8週齢の雄CD-1マウス600匹の腹腔内にコリキナセラリウム・ハルハム(ATCC 14827)を60 \times で1時間加熱して調製した死菌体を1mL、既往用投与し、通常一重線方法で7日間隔点滴、終了時に大腸菌由来の精製蛋白質標準液(0.5mg/ml)を投与した。1乃至2時間後、腎臓を腫瘍さげてマウスを屠殺し、心臓采血後、腎臓を摘出し、8倍量の50mMトリチウム水素(1Ci/7.3G)中、付着マウスサニに上を泡乳して抽出した。抽出物を約8,000r.p.mで10分間遠心分離し、得られた上清約9Lに緩和洗浄液(0.5Mトリチウム水素を含む50mM硫酸緩衝液 pH11.7, 3.3%亜硫酸ナトリウムが1.5%硫酸ナトリウムに加え、4°Cで1時間振搗後、約8,000r.p.mまで30分間遠心分離して当該蛋白質を含む上清約1.9Lを得た。

【6-1-2】 カラム精製を終る 1MNaCl 中で塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに付着した蛋白質（アセトニトリル濃度が約4.0%）を洗浄した。カラムを封鮮な同一液槽夜で洗浄後、 1MNaCl 中に下諸する硫酸アミニウムの濃度勾配下、 0.1mMNaCl の緩衝液（pH7.0）をS.V.（約5ml）を通過した。硫酸アミニウム濃度が約 0.1mM 付近の時に溶出した当該蛋白質を含む峰（約4.8-5.1）を採取し、那の峰に 0.1mMNaCl 緩衝液（pH6.5）に対する吸光度と時間関係を、予め 2.0mMNaCl 緩衝液（pH6.5）にて平衡化させて取ったフルベシタツドリ柱（ 1ml ）に注入して、約はるか 0.1mMNaCl 付近のカラムに付着したカラムを封鮮な同一液槽夜で洗浄後、 $0\text{M}\sim 0.2\text{MNaCl}$ 中に下諸する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに 0.1mMNaCl 緩衝液（pH6.5）をS.V.（約5ml）を通過したところ、当該蛋白質が約4.8-5.1M付近の塩化ナトリウム濃度で溶出した。

【0023】蛋白質を含む濾出液約260mlを採

取し、濃縮し、2.5 mM ビス-トリス緩衝液 (pH 7.1) に対して 4°C で 18 時間透析後、予め新鮮な同一の

純化して半固化させておいたフタロシアニン(Menoc-
-T)約2.4mlのカラムに負荷し、pH7からpH4

に上昇するや日均配下、カラムに1.0% (v/v) ホリバッカット-74 (pH 4.0) を通液したところ、pH が約4.8のときに当該蛋白質が溶出した。当該蛋白質を含む溶出液約2.3 ml を採取し、濃縮し、手で7 mM 硫酸水素二ナトリウム、3 mM 硼酸二水素ナトリウム放

10 び13.9mM塩化カリウムからなる混液(1117)。
 2)で平衡化させておいたファルマシア製「スーパーディスク」(7号)のカラムに負荷し、新鮮な同一部位を連続してケルン管クロマトグラフーしたところ、分子量
 1.9, 0.00ダルトン附近に当該蛋白質が溶出した。当
 該蛋白質を含む部分を採取し、濃縮して下記の実験例2
 に供した。取量は、マウス1匹当たり約0.6μgであ
 った。

$$\{(\pm\sqrt{2}, \pm 1)\}$$

【實驗題2】蛋白質的理化性質

1 (1) 1' 1)

【実験2-1 分子量】実験1で調製した精製蛋白質の分子量は、 α -ラクトアルブミン、第1、2、7名。第680～685頁(1970年)に報告している方法に準じ、電気泳動装置(TE-SDS-アリゲーター、日本電機製)を用いて各分子量標準(19,000、15,000、10,000ダルト)と相性する位置に上部より調導能ある毛細管(内径0.5mm)に挿入された。なお、このときの分子量標準は、 α -ラクトアルブミン(67,000ダルト)、カラメルアルブミン(45,000ダルト)、大西洋ホタテ殻質(セラミド)(26,100ダルト)及び α -ラクトアルブミン(14,400ダルト)である。

【 1 1 1 1 6 】

【後編2-2】等電位接続の導線にしたがってクロマトグラフを接続して上に示す図(1)、(2)に要領で示した。

〔 0027 〕

トブルー染色された当該蛋白質を含む部分を切り出し、凍結乾燥した。

【0028】次に、乾燥ゲルを1%で精製TPGKトリフラン $2\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む1.00 mM炭酸水素ナトリウム $0.1\text{--}5\text{ mM}$ 温化カゼイム及び0.02% (v/v) Tween-20水溶液からなる混液 0.6 mL に浸漬し、37°Cで18時間インキニアートして蛋白質をトリプシン消化した。そして、消化物を遠心分離して上清を採取する一方、沈殿部を0.001% (v/v) Tween-20を含む1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸 1 mL に浸漬し、室温下で4時間振盪後、遠心分離して上清を採取した。新たに生じた沈殿を0.001% (v/v) Tween-20を含む7.0% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸、0.001% (v/v) Tween-20を含む5.0% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸及び5.0% (v/v) 水性アセトニトリルの順序で上記と同様に処理し、得られた上清と上記で得られた上清をツールし、250 μL まで濃縮後、凍結乾燥した。

【0029】斯くて得られたペプチド断片を含む水溶液を、手袋 0.1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸で中和化させた重ソラーリ製高純度トリクロラブチ用カートリッジ HPLC (ODS-1204) に負荷し、カラムを0.1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸で洗浄後、溶出液中のペプチド濃度を吸光光度計により214 nm及び280 nm波長下でモニタしながら、0% (v/v) から7.0% (v/v) に上昇する水性アセトニトリル濃度勾配下、カラムに0.1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸を $0.5\text{ mL}/\text{ 分}$ の流量で通過した。そして、通過開始から7.5分後(約5.5分後)に溶出した画が、(A)、それを(ア)手すり断片A 又は(イ)手すり断片B と云う二種別々に採取した。このときの溶出パターンを図1に示す。

【0030】(ア)・(イ)・(ア)で精製された手すり断片A型(A)を用い、常法にしたがってこれらを手すり断片A及びBのアミノ酸配列を調べたところ、後者と同様に脱水性アミノ酸残基 α -アラニンを有していた。

【0031】

【実験2-1 生物作用】

【0032】

【実験2-1 (a)】免強免疫動物における手すり断片Aの赤道】8週齢雌性SD大鼠 10只 を用いて脾臓を摘出 \rightarrow 脾清浄管(日本生化)1640培地(小口7.4)中に差し、新鮮な同一培地で清浄後、不活性化液(小口8.0)中に浸漬して宿血させた。得られた脾細胞を1.0% (v/v) 牛胎児血清を補足した RPMI 1640培地(pH 7.4)に細胞密度 $1\text{--}10^6/\text{個}/\text{mL}$ になるように懸濁した後、和光純薬工業製細胞分離用チャコルカーキムに負荷 $0.5\text{ mL}/\text{ mL}$ (v/v) 中、37°Cで1時間インキニアートした。その後

カラムに1.0% (v/v) 牛胎児血清を補足した RPMI 1640培地(pH 7.4)を通じてT細胞を採取し、新鮮な同一培地で洗浄し、上記の手すり断片Aを用いた実験に供した。

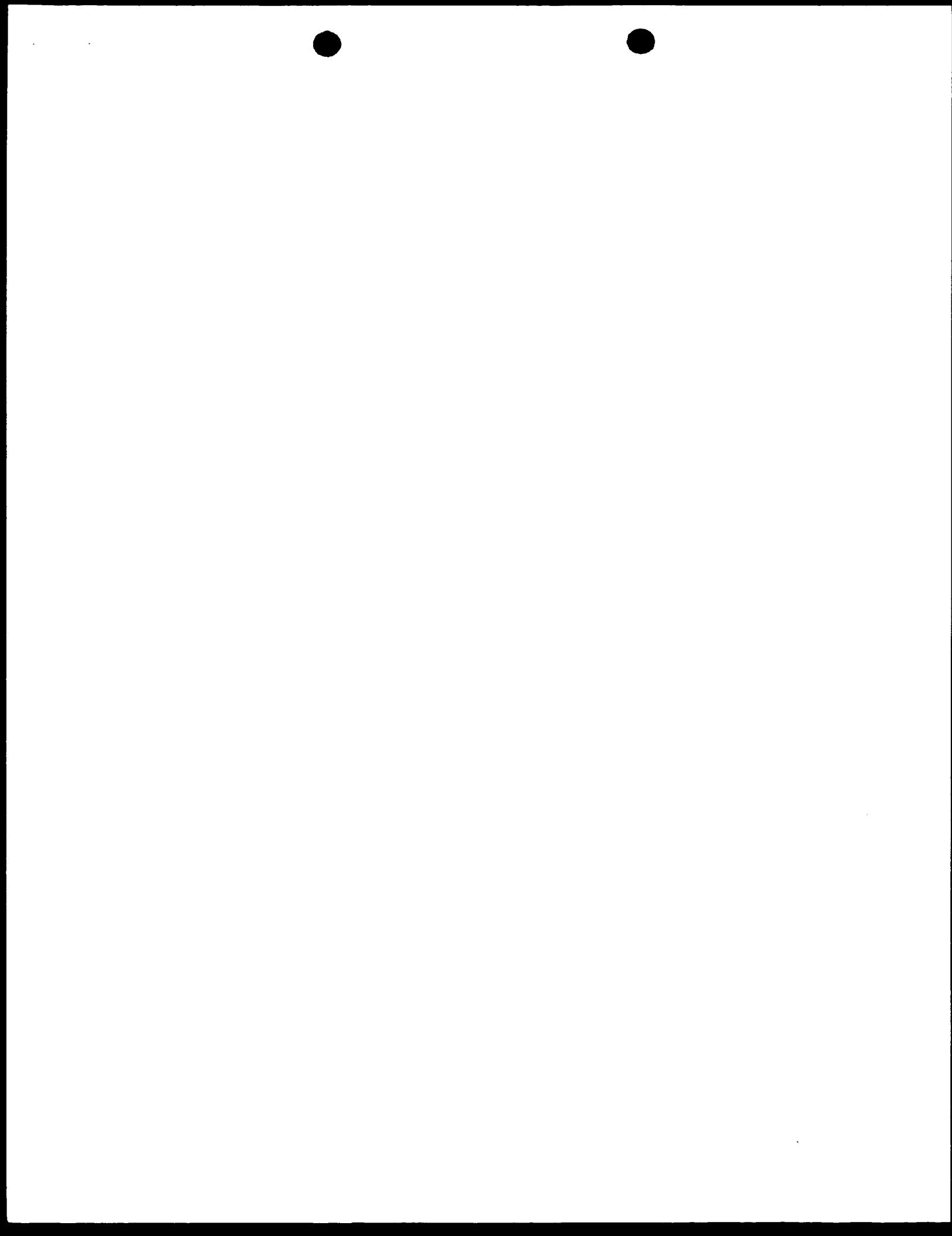
【0033】細胞密度 $1\text{--}10^6/\text{個}/\text{mL}$ になるように RPMI 1640培地(pH 7.4)に浮遊させたマウスT細胞を96ウェルマスクロプレート上に $0.15\text{ mL}/\text{孔}$ ずつとり、精製蛋白質を1.0% (v/v) 牛胎児血清を補足した RPMI 1640培地(pH 7.4)で適宜希釈して 0.05 mL 加えた後、 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ mL}$ のカナパリンAの存在下又は非存在下で5%CO₂インキュベータ中、37°Cで24時間培養した。その後、各ウエルから培養上清を 0.1 mL ずつ採取し、育生したIFN- γ を通常の酵素免疫測定法により測定した。同時に、精製蛋白質を省略した以外は同一の系を設け、これを上記と同様に処置して対照とした。なお、IFN- γ の標準品には、半田市立公衆衛生研究所から入手した標準マウスIFN- γ (G 02-901-533) を使用し、国際単位(IU)に換算して表示した。

【0034】その結果、対照系において有意なIFN- γ の産生が認められたが、(ア)に対して、精製蛋白質を施した系では顕著なIFN- γ の産生が認められ、0.02乃至1.0 IU/mLの用量で、(ア)カナパリンAの非存在下でマウスT細胞 $10^6/\text{個}$ 当たり約2乃至20.0 IU/mLのIFN- γ が産生していた。これに對比、精製蛋白質に直接作用するものは約1 IU/mLの産生を説明する作用のあることを裏付けている。

【0035】なお、この発明を通して精製蛋白質の1單位とは、(ア)カナパリンAの存在下で上記の手すり断片Aを1.60 IU濃度する蛋白質の量を定義する。

【0036】

【実験2-1 (b)】牛の脾細胞蛋白質精製】
1.0 g RBC(前上野動物園)を $1.0\text{ M}\text{ NaCl}$ 及びカルボキシル酸 1.0 M (v/v) 后者現用等量の RPMI 1640培地(小口7.4)に添加後(小口7.4)と同様に脱水性アミノ酸を精製する手すり断片Aを $0.1\text{ mL}/\text{ mL}$ (v/v) 加えた後、 0.5 mL 上清液をマスクロプレートに吸引した。培養液中に蛋白質濃度を $0.0\text{--}0.8\text{ mg}/\text{ mL}$ に調整した後、(ア)と同様に7.2%アルギン酸液(小口7.4)で洗浄後、洗浄液を吸引して脱水性アミノ酸カリウムで標識したYAC-1細胞(A.T.C.C. TIB-166)と共に幼年細胞一導的細胞比2.0:1又は4.6:1の割合で溶解した RPMI 1640培地(pH 7.4)に浮遊させた。細胞浮遊液を96ウェルマスクロプレートにとり、5%CO₂インキュベータ中、3



7°Cで4時間培養し、培養上清中の³⁵Crによる放射能をガムマカウンタにより測定した。結果を表1に示す。

【0037】表1の結果は、この発明の蛋白質にキラーチ細胞による細胞障害性を有意に増強する性質があり、し

かも、その性質がインターロイキン2により顕著に増強されることを示している。

【0038】

【表1】

作用因子		細胞障害性(%)	
当該蛋白質 (単位/ml)	インターロイキン2 (u/ml)	効果細胞/標的細胞	
		40/1	20/1
100	0	48.6	48.0
20	0	35.5	27.5
4	0	33.0	17.7
0.8	0	22.9	14.5
0	0	0.1	0.6
100	1	55.8	55.2
20	1	54.2	48.4
4	1	40.5	26.4
0.8	1	22.1	10.3
0	1	0.4	0.0
100	5	83.8	59.1
20	5	63.2	45.1
4	5	59.2	44.6
0.8	5	38.4	23.4
0	5	1.0	0.2
100	10	67.8	56.5
20	10	57.7	59.9
4	10	62.8	54.1
0.8	10	46.2	31.7
0	10	1.0	0.5

【0039】以上のような理化学的性質を有する蛋白質は未だ知られておらず、新規蛋白質であると判断される。そこで、本発明者が、マウス肝細胞からmRNAを単離し、これを鋸型に前述実験例2-3で明らかにした部分アミノ酸配列に基づき化学合成したcDNAマーの存在下でRT-PCR反応させて当該蛋白質を部分コードするDNAX断片を採取し、これをプローブにして上記mRNAから別途作製したcDNAライブリーを鈍感検索した結果、473基基対からなる、配列表における配列番号2に示す「末端からの塩基配列」のDNAX断片が得られた。この塩基配列を解読したところ、当該蛋白質は、157個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号3に示す「末端からのアミノ酸配列」を有していることが判明した。なお、配列表における配列番号3において、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、メチオニン又はトレオニンを意味するものとする。

【0040】配列表における配列番号3及び4に示すア

ミノ酸配列及び塩基配列を説明するに到った一連の操作を要約すると、次のようになる。

(1) クロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてマウス肝細胞から当該蛋白質を単離し、高度に精製した。

(2) 精製蛋白質をトリプシンで消化し、消化物から2種類のペプチド断片を単離し、そのアミノ酸配列を決定した。

(3) マウス肝細胞からmRNAを採取し、これを鋸型に上記塩基配列「末端からのアミノ酸配列」に基づき化学合成したオリゴスクレオチドを用いてRT-PCR反応させてDNAX断片を調製する一方、それら部分アミノ酸配列に基づき別途化学合成したオリゴスクレオチドをプローブにしてそれらDNAX断片を検索し、当該蛋白質を部分コードするDNAX断片を採取した。

(4) 別途、前記mRNAを鋸型にcDNAライブリーを作製し、これに上記で調製したDNAX断片をブリ

一つにしてハイフリダイスさせ、顕著な会合を示す形質転換体を採取した。

(5) 用置換法から D.N.A を採取し、その塩基配列を決定し、解読するとともに、解読したアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列を比較して、その塩基配列が当該蛋白質をコードしていることを確認した。

【0041】次の実用例3では、上記の工程(3)乃至(5)を中心に具体的に説明するが、本例で用いた手法自体は断片において公知であり、例えば、ティーラ・マニヤティス等「モレキュラー・クローニング・ア・ラオラトリー」(モントレー出版)、1989年、ローリー・スプリングス・ハイツ発行や、村松直美「ウボマエヌアル遺伝子工学」、1988年、丸善出版発行などにも記述されている。

[() . 1 2]

【実験例3 DNAの塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列】

[0043]

【機材】：(1) 全 RNA の合成：生細胞と同様にして調製したウツス肝細胞を墨で覆う量とり、これを GM 液中に浮かべてチオガルバート、 1.0 mM クロラント酸ナトリウム及び 0.5% Triton X-100 で SDS からなる混液 (pH 7.0) 2.0 ml に没滅し、チモグリセラーゼで破碎した。次に、脂質に見たがって、 3.5 ml 上清遠心管に 5.7 M 乙酸鉄ナトリウム 0.1 M EDTA (pH 7.5) を加え、上清とし、その上層に濃縮試料液を 1.0 ml 垂れし。この状態で 2.0% カゼイ 0.0001 pmole 及び 0.05 ユニットの酵素を加え、RNA 部分を弱めた。この RNA 部分を 1.0 ml 上清遠心管とり、等量のウロドヒトムーリズラクトルキラーゼ試液 (4 : 1) を加え、半分回振後し、 4.0 、 1.0 、 0.0001 pmole 1.0 分鐘遠心分離した後、上清を過濾し、 2.0 ml 倍量のエタノールを加え、 2.0% で固形化後して全 RNA を回収せた。この過程を繰り返し、 7.5 ml (v/v) 小糸はターバー柱で洗浄後、漏斗の漏斗より 1.0 ml に落成し、上部の其漏斗を用ひて、全量を 10 ml の吸量管に回収した。

[0014]

【実験用具】第一回の差別分離装置（D）：A面積の
範囲】実験例では、上部槽を全長 1m、下部槽に 2.5mM
重化セブ酸ナトリウムを 4ml、1.0×10⁻³M 緩衝液（1.0
0 mM Tris）と界面活性剤（pH 11.8）を、5.0 mM
蛋白質界面活性剤（市販品、1.0 mM）で上部槽を充
満する。上部槽に 1.0 M ナトリウムクエン酸ナトリ
ウムを、下部槽に 1.0 M ナトリウムクエン酸ナトリ
ウムを充填する。この両槽を密閉して、上部槽に 5
mM フラボン色素を、下部槽に加えて、減菌蒸留水で 2
0 ml とし、混和物を 0.5 ml に容積直管にとり、當
法にしたがって、30°C で 10 分間、4°C 30°C 30 分間
往復して、最初の分離、最後の分離インソルベントにて過濾
して色素を除き、第一回ランナード濃度を含む水溶液
を得た。

【0047】次に、代り歯口上岸場に偏頭酸アシル
リソマクターゼナフチル- β -D-ガラクト糖-1-Naと過量の
L-半胱酸ナトリウムを加え、10分間37°Cで
保温して過剰半胱酸を除去後、16°C以下の暗室
で一夜放置後、上清液を回収する。この上清液にD-半胱片を種
入り、得られた蛋白をエンドベーラー法によるセントゼン法によ
りアルカリ性アモニウム硫酸ナトリウム-Na₂CO₃-B-100 ml標液等
にて洗精を液体にして、得られた粗精蛋白質を1.0 g
とアラブリソマクターゼ、5 g、1摩化ナトリウム
50.15 g、1メチルアセト酸-19.0 mg、1アセチル

15
1.40 mg / 1X - Ga 1 及び 2.3 - 8 mg / 1イ
プロピル β -D-チオガラクトヒドロシル (以下、

IPTG (最終濃度: 1 mM) を含む DMEM 培地に植苗し、37°Cで24時間培養してコロニーを形成させた。常法にしたがって、プレート培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してコロニーを採取した後、ナイロン膜を剥離し、0.5 M 水酸化ナトリウム及び1.5 M 塩化ナトリウムを含む洗液に7分間浸漬して清浄した。その後、ナイロン膜を1.5 M 塩化ナトリウムを含む0.5 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.2) に3分間浸漬し、2×SSCで洗浄し、0.4 M 水酸化ナトリウムに20分間浸漬して固定し、5×SSCでさらに洗浄し、脱乾後、5% SSCP、5% PEG-4000液、0.5% (w/v) SDS 及び1.0 mg/ml 練性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション液に浸漬し、65°Cで3時間ハイブリダイゼーションした。その後、常法にしたがってナイロン膜にハイブリドをハイブリダイズ、6×SSCで洗浄後、前記洗浄液にオリゴヌクレオチドアッセイ、プローフ上昇著的な会合を示した形質転換操作をブロード培地から導出した。

【実験例3】3-mL(1A)の調製】実験例3-1で得た全R1、Aを適量水溶液(0~0.5mL±5%)とれて1mL、所用のAと1Aを0.1~1% (w/v) SDSを含む1.0mM²の水溶液(調節pH17~5%多孔性シリカゲル柱)に注入して、混合液は即ち、酸性側(0.1~1.0mL)と中性側(0.5~0.6mL)の各部に分離する。酸性側(0.1~0.3mL)は、0.5mLの初期調製液と同様性状であるが、中性側(0.5~0.6mL)は、1.0mMのR1と0.1~0.2mLの水溶液(調節pH17~5%多孔性シリカゲル柱)に注入して、混合液は即ち、酸性側(0.1~0.3mL)と中性側(0.5~0.6mL)の各部に分離する。

【0050】
【概要】(A)と(B)の生産】アラバマ州のC社は、(A)と(B)の合成を
専門とする会社である。C社は、(A)と(B)の合成を主な事業としている。
また、(A)と(B)の合成技術を用いて、(C)と(D)の合成も行っている。
C社は、(A)と(B)の合成技術を用いて、(C)と(D)の合成も行っている。
C社は、(A)と(B)の合成技術を用いて、(C)と(D)の合成も行っている。

1. 5mL各反応管に第一封管+FeCl₃試薬を加用

液4μl、ビロリシ酸ナトリウム溶液1μl、ヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター溶液1μl、デオキシリボヌクレオチド混合液2μl及びオリゴ(dT)₃₀溶液1μlをこの順序で加え、さらに、実験例3-3で得たmRNAを2μg加えた後、滅菌蒸留水を1.8μl加えた。混合液に逆転写酵素2.0単位を含む溶液1μlを加え、42℃で10分間反応させ、十分て第一ラムラのcDNAを含む溶液を得た。

【0.05.1】反応物に第二次下液にて EDTA 合成用溶液を 3.7, 5 フ.1、大腸菌由来のリボヌクレオチドアーゼ I を 0.18 単位、DNA ポリメラーゼ I を 2.3 単位まで加え、滅菌生理水で 1.00 フ.1 とした後、1.2°C で 60 分間、2.2°C で 60 分間保温して一旦、T4-DNA ポリメラーゼを 2 単位加え、3.7 フ.1 でさらに 1.0 分間保温して第二次下液にて DNA を含む反応物を得た。反応物に 0.125 M EDTA (pH 8.0) を 4 フ.1 加えて反応を停止させた後、常法により DNA を抽出し、エタノール沈殿法で純度の高い DNA を得れた。

20 【0.052】この場合に使用するDNAは、既經得
液を2ml、1ccのR1アガロゲル用5.0モル
リ、T4-DNaseと混ぜ、5中性のpHで加
水、滅菌蒸留水で0.5mlと見たら後、15°Cで16時間
以上放置してからDNaseは止む。この間で得
たDNAを過濾して上部を0.15M EDTAを2ml
加えて溶解を試みるが、通常は即ち分子量約10万
のDNAが既經得液中のDNase作用によって
既に上部に沈殿を生じ、分子量が約10万のDNA
が下部に残る。滅菌水で洗う量100mlとし
30 て、37°Cで30分間不活性化するR1ア
ガロゲルを分子量化した後、枝毛網を左側に持つ
白い手ぬぐい抽出吸紙の左側に毛細孔をDIN A4を採取
してDNAの量を測定する。分子量
を1.5mlの1.5mlのDNase作用液に5種類加
え、滅菌水を分子量1.5mlとし、15°Cで16時間
放置して上部を過濾して分子量が既に既經得
液を用いて用いた細胞収穫DNAを含む。

Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.0)に5分間浸漬した。ナイロン膜を5%SSCで湿き、風乾後、5%SSPE、5%テニカルト溶液、0~5% (w/v) SDS及びサケ精子DNAを10.0 μg/ml含む混液に浸漬し、6.5°Cで3時間インキュベートした。その後、ナイロン膜をアミヤム製DNAB標識キット(レディ・アカイムDNA標識システム)を用いて「P標識したヌクレオチド3'-2'で得たプローフ2に対してのDNA断片の濃量を5%SSPE、5%テニカルト溶液、0~5% (w/v) SDS及びサケ精子DNAを10.0 μg/ml含む混液中、6.0°Cで2.0時間インキュベートしてハイブリダイゼーション後、同様にオートラジオグラフィーして、プローブの強度を合計算出した。DNAの濃度を算出した。

【0054】常法にしたがってこのクローンを大腸菌中に増殖し、菌体から組換えDN_Aを抽出した。組換えDN_Aを制限酵素 Eco-R I で切断する一方、プラスミドクランプ pET-10 (λ ATCC 37294) を同じ制限酵素で切断し、得られたDN_A断片とプラスミド断片を等量に混合しDN_Aリガーゼで連結して組換えDN_Aとした。そして、この組換えDN_Aを細胞内にゼラチンセラフィンに包り大腸菌JM109 (λ ATCC 15403) に導入し、子孫細胞を培養

[0.0 0.0]

【特許第111号】以上で述べたように、免疫抑制剤の開発は主として上記二つの発明を基礎とする蛋白質における。本発明者は長年にわたり研究の一成果として見出されたものであり、確定された蛋白質には見られない独特の理化学的性質を具備している。この発明によれば換えられ式抗体を応用するにとどまらず、この蛋白質を有機化するものである。日本特許公報等を参照しながら、この発明の蛋白質とその製法方法等について、具体的に説明する。

【0057】この発明でいう蛋白質とは、特定の理化学的性質を具備する、天然由来の蛋白質及び經換元の、A技術により創製された蛋白質を意味する。この蛋白質の蛋白質質、通常、¹番号は全部で20個されたアミノ酸配列を有しており、その一例として、例をば、配列表における配列番号3に示す。本発明のアミノ酸配列、それに相同意的なアミノ酸配列が得られる。手順番号3のアミノ酸配列に相同意的なアミノ酸配列を有する変異体は、所開の生物作用を実験的に與えることなく、配列番号3のアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なむ、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAsを含む脂防酸換代の培地で使用する脂防地の成分、組成、培養温度、同じときに於ては、宿主内酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所開の生物作用を保持しているもの、配列番号3のアミノ酸配列における末端付近のアミノ酸が1個又は2個以上欠失した、又末端に1個又は2個以上のアミノ酸を新たに付加した変異体を用いることである。既から是変体も、それらを直接担質細胞に付けて生産させ、アミノ酸生産量を測定すればなり、当然、この発明の蛋白質に包含され
10 20

【0068】この発明の前段では、著者等は「本発明の
目的を達成するためには、本発明の前段で述べたとおりに、
前段後項の方法によれば、本発明の目的が達成される。
この発明で使用する形質質子体は、例えは、配列表に掲げた混列播号式表示装置のうちの地図記憶部
に示すように制御的構造を備えてこれらに接続する
機器の各部を適宜前に導き付けておき、すり替えて
走行させる。なお、上記各配列は、音波子の車両を利用した
ものであるが、本配列を用ひてではなく、風景
の1種類は他の風景を他の場所に運ぶことをもつて、
また、音波子の中には主に音波子自身の音波を発現
するものと、音波子の音波を受ける他の音波を出
する音波子があるが、本得点は、音波子の側に集
合する音波子の出力を音波子の上に示す。

得られた組換えDNAを大腸菌などの適宜宿主に導入して形質転換体とする。この形質転換体を生養培地で培養し、培養物にコロニー・アイフィタセー法を適用してこの発明の蛋白質をコードするDNAを含む形質転換体を採取する。斯くて得られた形質転換体を通常一般の方法により処理すれば、この発明のDNAが得られる。一方、この発明のDNAを入手するには、例えば、配列表における配列番号1に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列をコードするDNAを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から蛋白質を分離し、その蛋白質から当該DNAを含むプラスミドを採取すればよい。

【0060】斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでおり、DNAが入手できれば、通常、選択的組換えDNA技術により比較的容易に調製することが可能である。斯かるベクターの例としては、例えば、pRK223-2、pGEM-2T、pE1-2、pB1-p2-DNA、pUB110、YEp127、T1R2-M13、L11-PK211、pB1121などのプラスミドベクターが挙げられ、このうち、この発明のDNAを大腸菌、枯草菌、酵母などの原核生物で表現させるにはpRK223-2、pGEM-2T、pE1-2、pB1121、pUB110、YEp127が、また、真核生物由来の前で表現させるにはL11-PK211、T1R2-M13、pB1121が好適である。

【0061】斯かるベクターによる表現の時に、DNAを組み入れるには、脂界に付けて通常、発現方法が採用される。組み入れるには、先ほどの発明において、DNAを含む組換え子と自律複製可能なベクターを組み合わせて、組合せ後は接着波によく切離し、次に、生成したDNA断片を、DNA切断剤と組み合わせて、組合せたDNAを切断する。次に、組合せたDNAを用いる組換え子と組み合わせて、L11-PK211、T1R2-M13、Bam-HI、Kpn-I、Xba-Iなど、Pst-Iなどを使用すれば、DNA断片をカットする。断片を連結する際の接合法としては、DNA断片の端を、断片を連結する際は、必要に応じて、両端を変性させることによって、生体内では生材料外でDNAリガーゼを作用する様にして、期せずして組み合わせて組換えDNAを、適宜宿主に導入して形質転換体とする。これで培養するときに有効な組換え技術である。

【0062】この発明の組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、酵母を始めとする適宜の宿主に導入することができる。組換えDNAを組み入れて存在する宿主を細胞法やアロトロホーリ法を適用すれば、形質転換体を採取する。一方、宿主が枯草菌の場合には、この選択的セル法やアロトロホーリ法を適用すればよい。形質転換体を

クローニングするには、コロニー・アイフィタセー法を適用するか、栄養培地で培養し、免疫担当細胞において上記、 α の蛋白質を誘導する。前者よりものをを選択すればよい。

【0063】斯くて得られる形質転換体は、生養培地で培養すると、菌体内外に蛋白質由来を産生する。生養培地には、通常、炭酸ガス、硝酸塩、ミネラル、またには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量元素を補足した通常一般の液体培地を使用され、個々の炭素源としては、澱粉、蔗糖加かり物、グルコース、果糖、並糖などの糖類が、また、窒素源としては、例えは、アラニニアアラバモウム、尿素、硫酸銅、ペプチド、酵母エキス、蛋白質粉、コラーゲンアブリマー、肉エキスなどの含氮基團乃至有機物が与げられる。形質転換体を斯かる生養培地に植菌し、生養培地を温度25乃至65°C、pH2乃至8に保ちつつ、通気搅拌などによる好気的条件下約1乃至10日間培養すれば、蛋白質由来を含む培養液を得られる。この培養液はIFN- α 誘導剤としてそのまま使用可能ではあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、透析液や脱脂醇醣素により菌体を破壊した後、濃縮、遠心分離などを繰り返す蛋白質を粗抽出物とし粗抽出物から分離し、精製する。精製には蛋白質を粗抽出物を除去した培養液に、例えは、透析、振搗、透析、分別沈殿、グルコン酸カルシウムアリメタノール、アソチアヌチアグロマトリック、鉄カリウムアリマトリック、アルミニウムアリマトリック、多孔性アフィニティカラム、透析等の誘導、透析槽電荷吸引剤などの生産過程物質の精製方法も適応する。必要に応じて、前記の方法を用いて、必要に応じて、これら方法を適宜組合せれば、所要して最終使用形態に成して、精製した蛋白質を純度・活性既定にて液状若しく封入保存すればよい。

【0064】前述のとおり、この実験の蛋白質は、免疫担当細胞に取り込まれて増殖分裂する細胞を有する。この特徴によりて、この種の蛋白質は、通常培養液、蛋白質粗抽出液、粗抽出物、細胞上清液、さらには、L11-PK211、T1R2-M13、Bam-HI、Kpn-I、Xba-Iなど、Pst-Iなどを使用すれば、DNA断片をカットする。断片を連結する際の接合法としては、DNA断片の端を、断片を連結する際は、必要に応じて、両端を変性させることによって、生体内では生材料外でDNAリガーゼを作用する様にして、期せずして組み合わせて組換えDNAを、適宜宿主に導入して形質転換体とする。これで培養するときに有効な組換え技術である。

【0065】この発明の蛋白質は、通常、免疫担当細胞で培養液、蛋白質粗抽出液、粗抽出物、細胞上清液、L11-PK211、T1R2-M13などの細胞内に高頻度で存在する蛋白質であり、前者の用法に依れば、細胞内に高頻度で存在する蛋白質が、例えは、L11-PK211、T1R2-M13などの細胞内に高頻度で存在する蛋白質を含む蛋白質を含有する培養液に投入されると、免疫担当細胞を、L11-PK211、T1R2-M13などの細胞内に高頻度で存在する蛋白質を含む蛋白質を含有する培養液に投入されると、免疫担当細胞を、IFN- α 誘導剤としてそのまま使用可能ではあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、透析液や脱脂醇醣素により菌体を破壊した後、濃縮、遠心分離などを繰り返す蛋白質を粗抽出物とし粗抽出物から分離し、精製する。精製には蛋白質を粗抽出物を除去した培養液に、例えは、透析、振搗、透析、分別沈殿、グルコン酸カルシウムアリメタノール、アソチアヌチアグロマトリック、鉄カリウムアリマトリック、アルミニウムアリマトリック、多孔性アフィニティカラム、透析等の誘導、透析槽電荷吸引剤などの生産過程物質の精製方法も適応する。必要に応じて、前記の方法を用いて、これら方法を適宜組合せれば、所要して最終使用形態に成して、精製した蛋白質を純度・活性既定にて液状若しく封入保存すればよい。

エンやインターロクキン2、抗CD3抗体などのT細胞活性物質を加え、培養槽の温度約30乃至40°C、pH7.0乃至7.4に保つ。培養槽の表面を新鮮なものと取替をながら、通常一般の方針により約1乃至10時間培養する。斯くて得られる培養物を生理活性物質を精製するための通常一般の方法、すなはち、濃縮、固相、透析、分別沈殿、ケルヒャー法マトリクスフィルター、イオン交換マトリクスフィルター、疎水マトリクスフィルター、アフィニティマトリクスフィルター、“ロマトフォーカン”等、ケルヒヤー動、等電点電気泳動などの1種若しくは2種以上を適宜組合せて適用することにより、上記の活性物質を採取することができる。

【(0106)】一方、上記第一の特許権は、被誘導剤を投与する方法・手筋のたぐには、哺乳類の体内にこの発明による IFN-γ 誘導剤を直射接種すればよい。具体的には、この発明の IFN-γ 誘導剤を投与に適した適宜剤型に調製後、哺乳類に経口投与するか、例えは、皮内、皮下、筋肉内、靜脈内又は皮下静脈内に注射する。この実際の蛋白質を投与し得る哺乳類はヒトに限定されず、例えは、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ネコ、サル、ウサギ、牛、羊、馬等、上記以外、アフリカ岩鼠等の脊椎動物であつてもよい。この発明の蛋白質は強力な上記 IFN-γ 誘導剤を有するに過ぎず、一般に少量で周期性上記 IFN-γ を産生を誘導する、また、毒性の弱い点、副作用の少なさ、多量接種しても重篤な副作用を示さないことが特徴的。したがって、この発明の蛋白質は、使用に際して用量を非常に簡便しなくて、再灌り上記 IFN-γ 產生を直射接種で容易に得られる。

【（007）】それで、この発明の特質は多くの段落による。何卒特許を尊重する皆様を歓迎いたしますが、本件の特許権は、各種機械的因子を適当に用いることにより、電子充電装置による肺癌、胃潰瘍、直腸などの内臓病を治療する目的で、特に充電装置の構成を有する内臓病治療装置に対する特許権であることを記す。

【006号】关于那首歌被你取缔了，星期天晚上，我第一次唱这首歌，你批评我唱得不好，还说你不喜欢我唱的歌，那时我多伤心啊！

10/10/2013

【実験1】複数可能基團を用いたDNA変性液の検討】試
料濃度10 μg/ml、Gene Amp 1170A PCR
マシンを使用し、PCR増幅法の方法により得た全
DNAsが溶けた状態。上：下限濃度を調節した溶液を
1.0 μl、下：濃度を1.0 μlとし、各溶液に1.0 μlの
4×TAE (1.0 × 10⁻² M)を添加後、1.0 mMのDTTと
PMSカラムを各1.0 μl単位で、DTTは20 μlの量とし
ビタミンEを1.0 μlとし、各単位、各子の神戸万能酵素を1 μl
と、2.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動装置
の1.0%溶液に注入して得た全DNAs（1.0 μl）を注入し、凝固
後溶液が溶けた（0.5-1.0倍した）。そして、温浴を25°Cで20
分間、42°Cで30分間、90°Cで5分間、5°Cで5

分間に東洋子でインキュベートして第一アラカルトのDNAも反応物を得た。

【6.7.7】この培養液を 0.5 ml とり、これに 0.5 ml
MB増化マダラシウムを 4.0 g/L、1.0% PEG E緩衝液を 8
ml、2.5 単位 ニトランブリタックDNaseリバーザー^セを 0.5 ml ずつ、配列式の配列条件における以本端
及び中端付近のミクロン列に活性化常温封じたる

CGAGGGATCGAACTTGTGCCGAC
ETC-B 又は^{5'}-CGAGGAATTCCTAA
10 CTTTGATGTAAG-3'で表わされる核酸配列
のセンスプライマー及び反対センスプライマーの濃量
を加え、純度蒸留水で1.0 mlを1.0 mlと、次に、同法に
より、この混合物を9.4%で1分間、5.5%で3分間、
7.2%で3分間に3の順序でインキュベートするサイクル
を4.0回繰返し、得られたPCR産物を制限酵素Bam
HI及びEco RIで切断してBam-HI-Eco
RI-DNA断片を得た。

【6.7.1】このDLS-ACT用を遮蔽の波高蒸留水中に1.0.0mMより、これに、予め制剤酵素Bam-HI及びEco-RIで切削してえたフルクルクス製するアミノ酸カートリジン(2%)を1.0mg、遮蔽の1.4-ブロムブチルセラミド(1.0mM)ATPを最終濃度1mMのままに加えた後、1.0℃で1.0時間分子量測定を行なった結果を図6-CAS-8-6-2様に示す。また、遮蔽した結果を同じくCAS-8-6-2セクションにて示す。遮蔽した結果を図6-CAS-8-6-2様に示す。また、遮蔽した結果を同じくCAS-8-6-2セクションにて示す。

39) 【0072】この脱殻毛DNAを「pNGE(G-1)」と
名づけられたものに、その構造等の特徴と共に取り扱ったところ、図2に見られるように、「pNGE(G-1)
」に比して長時間作用する蛋白質分子1の分子量基準例
の結果では、脱殻DNAが主として100kDa級及び200kDa
級の分子量を持つことを確認したところである。

〔 二 〕

【材料と方法】市販酵母粉による蛋白質濃度測定法(以下略)を用いた。すなはち、得た粗細胞懸液をアセトニン(50 g/L)に上40 mLを加え、浮遊培地(pH 7.2)に種々に稀釈し、振動しながら30分間(120回/秒)保温した。細胞懸液を1%のアセトニンで洗浄後、浮遊培地を1.8 mLの同一直接に種菌液(3.0 mL)を加え、浮遊培養した。その後、培養液(0.5 mL)は、浮遊培養液(吸光度が最大)を用いて時計で11.0 Gの酵素濃度(1 mM)まで加え、さらに5時間培養した。そこで、達成仔細に水と培養物から酵母を採取し、1.50 mLの塩化ナトリウム(1.6 mM過酸化水素)を十分注入し、及ぶ4 mM硫酸(水素力1.0)の混合液(混液 pH 7.3)に浮遊させ、常法により超音波処理後、菌体破碎物50 mLを遠心分離し、上清を採取した。

【0074】この上清を予め15.0 mM塩化ナトリウムを含む5.0 mMトリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化させておいたフェルマニア製「グルタチオン・セファロース4B」カラムに負荷し、新鮮な同一緩衝液で洗浄後、カラムに5 mM還元型グルタチオンを含む5.0 mMトリス・塩酸緩衝液(pH 8.0)を通液して蛋白質を溶出させた。次いで、蛋白質を含む部分に採取濃度が2.5 mMになるように塩化カルシウムを加えるとともに、トロンビンを1,000単位加え、25°Cで18時間アミノキューへートし、反応物を予め15.0 mM塩化ナトリウムを含む5.0 mMトリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化させておいたグルタチオン・セファロース4Bカラムに通液して非吸着部分を採取した。その後、この部分を濃縮し、凍結乾燥したところ、比活性約5×10³ 単位/mg蛋白質の当該蛋白質を含む固状物が増殖物1.1 当たり約3mgの量で得られた。

【0075】実験例2と同様にしてこの精製蛋白質の理化的性質を調べたところ、この精製蛋白質は、SDS-ペリアクリルアミドゲル電気泳動方法又はゲル過濾法により測定するとき分子量は、1000-15,000 kDaである。また、ウロコトフォーカシング法により測定するときも、1000-15,000 kDaで、常に等電点を示す。更に例2-4の方法により試験したところ、精製蛋白質は、ココカクタリーアの非存在下及び存在下で免疫担当細胞におけるT細胞活性をよく誘導し、また、キラー細胞の殺傷活性も顕著に増強した。これは、粗換えDFA蛋白質にあっても、当該蛋白質を製造し得ることを裏付けるものである。

【0076】

【発明の効果】この発明は、免疫担当細胞においてT細胞活性を誘導する新規な蛋白質を発見に基づくものである。この発明の蛋白質は、通常、アミノ酸配列の

配列

He	He	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Leu	Asn	Leu	Asp	Asp	Ile	Gln
1															10	15
Ser	Asp	Leu	He	Phe	Phe	Gln	Lys									
			20													

【0077】配列番号:2

配列の長さ:18

配列の型:アミノ酸

配列

Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	He	Asp	Gln	Leu	Asn	Ser	Glu	Pro
1															10	15
Gln																

【0082】配列番号:3

配列の長さ:157

配列の型:アミノ酸

配列

Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	He	Arg	Asn	Ile	Asn	Asp
1															10	15

一部又は全部が消滅された物質であり、免疫担当細胞において安定したIFN-γ誘導能を發揮する。これにより、この発明の蛋白質は、細胞培養法によりIFN-γを製造するためのIFN-γ誘導剤として、さらには、IFN-γに感受性を有するウイルス性疾患、悪性腫瘍、免疫疾患、炎症に対する治療剤・予防剤として多種多様の用途を有することとなる。

【0077】この発明の蛋白質は強力なIFN-γ誘導能を有することから、一般に少量で所期のT細胞活性を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を引き起さることがない。したがって、この発明の蛋白質は、使用に際して用量を厳密に管理しなくても、所望のT細胞産生を迅速に誘導できる利点がある。従えて、この発明の蛋白質はキラー細胞による細胞障害性を増強する性質が顕著なことから、インターロイキン2や腫瘍壞死因子と適宜併用することにより、粒子免疫療法による腫瘍、骨髄腫、乳癌などの抑制効果を含む複数重層の治療における治療効果や副作用の改善に有用な効果を発揮する。

【0078】既にも有用なこの発明の蛋白質は、これをコードするこの発明のDNAを用することにより、所望量を容易に調製することができる。

【0079】この発明は、斯らも顕著な作用効果を發揮するものであり、世界に貢献すること誠に多大な意義のあるものであると言える。

【0080】

【配列】配列番号:1

配列の長さ:26

配列の種類:アミノ酸

トホカクタリーア

配列の種類:アミノ酸

フランメント種類:中間階フランメント

【0081】配列番号:2

配列の種類:アミノ酸

40 フランメント種類:中間階フランメント

【0082】配列番号:3

配列の種類:アミノ酸

40 フランメント種類:中間階フランメント

23

24

Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp
 20 25 30
 Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile Tyr Met Tyr
 35 40 45 50
 Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser
 55 60 65
 Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met
 70 75 80 85
 Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln
 90 95 100
 Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu
 105 110 115
 Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu
 120 125 130 135
 Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn
 140 145 150
 Leu His Gln Ser
 155

【0083】配列番号：4

配列の型：核酸

配列の長さ：471

20

配列

AACTTGGCC GACTTCACTG TACAACCGCA GIAATACGGA ATATAATGA CCAAGTCCTC 60
 TTCTGTGACA AAAGACAGCC TGIGTTCGAG GATATGATG ATATGATCA AAGTGCAGI 120
 GAAACCCCAGA CCAGACTGAT AATATACATG TACAAGACCA GTGAAGTAAG AGGACTGGCT 180
 GIGACCCCTCT CIGTGAMGA TAGTAAAYAG TCTACCCCTC CCTGTAAGAA CAGCATCATT 240
 TCCTTITGAGG AAAIGGATCC ACCTGAATAAT ATIGATGATA TACAAAGTGA TCTCATATIC 300
 TTTCAGAAAC GIGITCCAGG ACACANCAAG ATGGAGTTG AACITCTACT GTATGAAGGA 360
 CACTTCTCTG CTGGCCAAAA GGAAGATGAT GCTTCAAAAC TCAATCTGAA AAAAAGGAT 420
 GAAAATGGG ATAAAATCTGT AATGTCACT CTCACIACT TACATCAAAG T 471

【0084】配列番号：5

30 配列の特徴

配列の長さ：471

起源

配列の型：核酸

生物名：マウス

鎖の数：1本鎖

配列の特徴

下ホロジー：蛋白質

配列を表す記号：1-471 rat peptide

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT 48
 Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
 1 5 10 15
 GAC CAA GTT CTC TIC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GIG TIC GAG GAT ATG 96
 Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 ACT GAT ATT GAT CAA AGI GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CIG AIA AIA 144
 Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Ile Arg Leu Ile Ile
 35 40 45
 TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GCA AGA GGA CIG GCT GTG ACC CIC TCT 192
 Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Ile Ala Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CIC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT 240
 Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Ile Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile

25		26	
65	70	75	80
TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT			288
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Asp Ile Glu ser			
85	90	95	
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG			336
Asp Leu Ile Phe Phe Glu Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met glu			
100	105	110	
TIT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TIT CTT GCT TGC CAA AAG GAA			384
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu			
115	120	125	
GAT GAT GCT TIC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT			432
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp			
130	135	140	
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT			471
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Glu Ser			
145	150	155	

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の蛋白質をトリプシン消化して得られるペプチド断片の高速液体クロマトグラフィーにおける溶出パターンを示す図である。

【図2】この発明による組換えDNAであるpMGTG-1の構造を示す図である。

【符号の説明】

MGTG-1 cDNA この発明の蛋白質をコードするcDNA

【図1】

P t a c

t a c プロモータ

G S T

グルタチオンSトランス

P x ラーゼ遺伝子

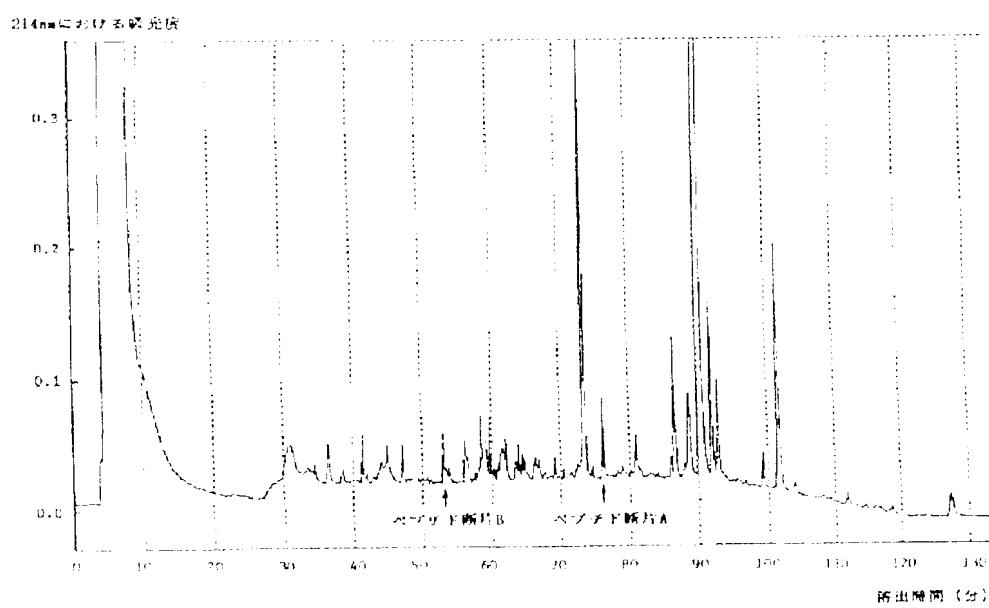
Amp R

アンピシリン耐性遺伝子

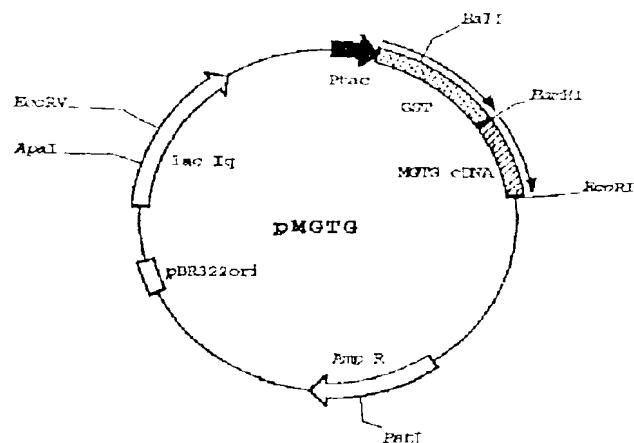
ori

大腸菌における複製開始

点



【[x] 2】



〔手稿補正書〕

【提出日】平成6年8月29日

【手續補正】

【補正対象書類名】明細書

【補正對象項目名】請求項9

【補正方法】梁更

【補充內容】

【請求項9】 DN Aが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を産えることなく、配列表における配列番号4に示す塩基配列にもむかう塩基1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項7又は8に記載の複製可能な組換えDN A

【手稿補訂2】

【御正封多吉類著】明細書

【補正對象項目名】請求項目

【卷之三】

【插入內容】

【請求項13】 D-ヒルが、遺伝子コードの縮重中に基^スき、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を含えることなく、配列表における配列番号4に示す塩基配列における塩基が1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項1-1 又は1-2に記載の形質転換体。

【手稿補遺3】

【補正対象出発行】明細書

【前言对象项目】清晨项目

【補充方法】變更

【插图内存】

【請求項19】 DN Aが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号4に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換し

たものである請求項1-6、17又は18に記載の蛋白質の製造方法。

【第4章】

【補正対象書類名】明細書

【補正好評項目】 0046

【修正方法】更正

【插入内页】

【0046】このようにして得たPCR産物の一部を取り、常法により0.5% (w/v) アガロースゲル上で電気泳動して分画し、ナイロン膜上に移し取り、0.4 N 水酸化ナトリウムで固定し、2×SSCで洗浄し、脱乾後、5×SSPE、5×デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び1.00 μ g/m¹ 純性サケ精子DNAを含む5% ハイブリダイゼーション緩衝液に浸漬し、65°Cで3時間分子印をブローットした。別途、プローブ1として、重複長の配列番号1における 5'-G-T-T-G-T-T-A-C-T-T-3' で表わされる核基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、ラジカルATPとT4ホリズタリオチドキナーゼにより同位体標識した。このプローブ1を1 pmolとし、これと5×SSPE、5×デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び1.00 μ g/m¹ 純性サケ精子DNAを含む緩衝液にナイロン膜を浸漬し、65°Cで3時間分子印をブローットしてハイブリダイゼーションをナイロン膜を6×SSCで洗浄し、常法によりオートラジオグラフィーしたところ、目的とするDNA断片がP-32ラベルにて認められていた。

【手稿指正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0075

る cDNA

P tac

tac プロモータ

GST

グルタチオン S トランスフェ

ラーゼ遺伝子

Amp R

アンピシリン耐性遺伝子

pBR322ori

大腸菌における複製開始点

【手続補正5】

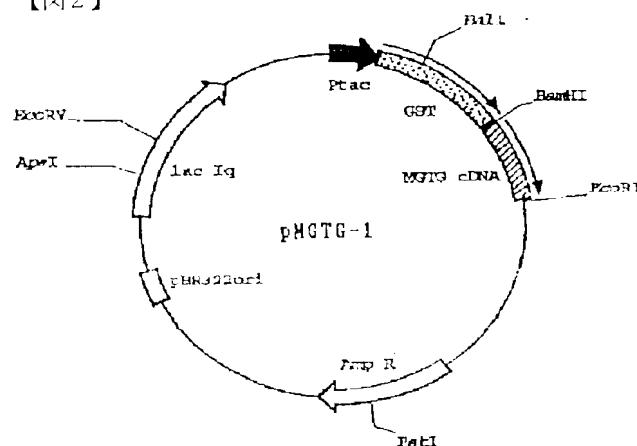
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】



フロントページの続き

(51)Int.C1.	識別記号	序内整理番号	F.I	技術表示箇所
C12P 21-02	ZNA	F-9282-4B		
C07K 14-57			A61K 37-02	ABH
				AED
		9231-4B	C12N 15-00	A

[Document name] Specification

[Title of the Invention] Interferon- γ production inducing protein

[Claims] 1. A protein having the following physicochemical properties:

(1) Molecular weight

19,000 \pm 5,000 daltons on gel filtration and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(2) Isoelectric point (pI)

4.8 \pm 1.0 on chromatofocusing;

(3) Partial amino acid sequence

Possessing partial amino acid sequences in SEQ ID NOS:1 and 2; and

(4) Biological activity

Inducing the interferon- γ production by immunocompetent cells.

2. The protein as claimed in claim 1, which has the amino acid sequence containing the N-terminal in SEQ ID NO:3 (where the symbol "Xaa" means "methionine" or "threonine") or a homologous amino acid sequence to the amino acid sequence.

3. A DNA encoding the protein as claimed in claim 1 or 2.

4. The DNA as claimed in claim 3, which contains the base sequence containing the 5'-terminus in SEQ ID NO:4, a homologous base sequence to the base sequence, or a complementary base sequence to these base sequences.

5. The DNA as claimed in claim 3 or 4, wherein one or more bases in SEQ ID NO:4 are replaced with other bases by means

of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:3.

6. The DNA as claimed in claim 3, 4 or 5, which is derived from mouse liver.

7. A replicable recombinant DNA, which contains a self-replicable vector and a DNA encoding the protein of claim 1 or 2.

8. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7, which contains the base sequence containing the 5'-terminus in SEQ ID NO:4, a homologous base sequence to the base sequence, or a complementary base sequence to these base sequences.

9. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7 or 8, wherein one or more bases in SEQ ID NO:4 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.

10. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7, 8 or 9, wherein said vector is pGEX-2T.

11. A transformant obtainable by introducing into an appropriate host a replicable recombinant DNA which contains a self-replicable vector and a DNA encoding the protein of claim 1 or 2.

12. The transformant as claimed in claim 11, which contains the base sequence containing the 5'-terminus in SEQ ID NO:4, a homologous base sequence to the base sequence, or a complementary base sequence to these base sequences.

13. The transformant as claimed in claim 11 or 12, wherein one or more bases in SEQ ID NO:4 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.

14. The transformant as claimed in claim 11, 12 or 13,

wherein said vector is pGEX-2T.

15. The transformant as claimed in any one of claims 11 to 14, wherein said host is a microorganism of the species *Escherichia coli*.

16. A process for preparing a protein, which comprises (a) culturing a transformant capable of forming the protein of claim 1 or 2 in a nutrient culture medium, and (b) collecting the formed protein from the resultant culture.

17. The process as claimed in claim 16, wherein said transformant is obtainable by introducing into an appropriate host a replicable recombinant DNA which contains a self-replicable vector and a DNA encoding the protein of claim 1 or 2.

18. The process as claimed in claim 16 and 17, wherein said DNA contains the base sequence containing the 5'-terminus in SEQ ID NO:4, a homologous base sequence to the base sequence, or a complementary base sequence to these base sequences.

19. The process as claimed in claim 16, 17 or 18, wherein one or more bases in SEQ ID NO:4 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:3.

20. The process as claimed in any one of claims 16 to 19, wherein said vector is pGEX-2T.

21. The process as claimed in any one of claims 16 to 20, wherein said host is a microorganism of the species *Escherichia coli*.

22. The process as claimed in any one of claims 16 to 21, wherein the protein formed in the step (a) is purified by one or more purification methods selected from the group consisting of concentration, salting out, dialysis, preparatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography,

hydrophobic chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectric point electrophoresis.

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

The present invention relates to a novel protein which induces the interferon- γ (hereinafter abbreviated as "IFN- γ ") production by immunocompetent cells.

[Prior Art]

It is said that IFN- γ is a protein which has antiviral-, antioncotic- and immunoregulatory-activities and which is produced by immunocompetent cells stimulated with antigens or mitogens. Because of these biological activities, IFN- γ has been expected for use as an antitumor agent from the beginning of the finding, and studied energetically for clinical trials as a therapeutic agent for malignant tumors in general including brain tumors. IFN- γ preparations now commercially available are roughly classified into 2 groups, i.e. natural IFN- γ s produced by immunocompetent cells and recombinant IFN- γ s produced by transformants prepared by introducing DNAs which encode the natural IFN- γ s into microorganisms of the species *Escherichia coli*. In the above clinical trials, either of these IFN- γ s is administered to patients as an "exogenous IFN- γ ".

Among these IFN- γ s, the natural IFN- γ is usually produced by culturing established immunocompetent cells in nutrient culture media supplemented with IFN- γ inducers to form IFN- γ , and purifying the IFN- γ . It is known that the type of IFN- γ inducers greatly influence on the production yield and the facility of IFN- γ purification, as well as the safeness of the final products. Generally, mitogens such as concanavalin A (Con

A), *Lens culinaris*, *Physiotaeca americana*, endotoxin and lipopolysaccharide are used. These mitogens, however, have problems of their molecular and quality varying dependently on their origins and purification methods, as well as the difficulty of obtaining a desired amount of preparations with a constant IFN- γ inducibility. In addition, most of these mitogens induce unfavorable side effects when administered to living bodies, and some of them even cause toxicity, so that it is substantially difficult to induce the IFN- γ production by the direct administrations to living bodies.

[Object of the Invention]

In view of the foregoing, the object of the present invention is to provide a novel protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells.

It is another object of the present invention to provide a DNA encoding the protein.

It is further object of the present invention to provide a replicable recombinant DNA which contains the DNA and a self-replicable vector.

It is yet another object of the present invention to provide a transformant obtainable by introducing the recombinant DNA into an appropriate host.

It is another object of the present invention to provide a process for preparing the protein by the application of the recombinant DNA technology.

[Means to Attain the Object]

The first object of the present invention is attained by a protein having the following physicochemical properties:

(1) Molecular weight

19,000±5,000 daltons on gel filtration and

sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(2) Isoelectric point (pI)

4.8±1.0 on chromatofocusing;

(3) Partial amino acid sequence

Possessing partial amino acid sequences in SEQ ID NOS:1 and 2; and

(4) Biological activity

Inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The second object of the present invention is attained by a DNA which encodes the protein.

The third object of the present invention is attained by a replicable recombinant DNA which contains the DNA and a self-replicable vector.

The fourth object of the present invention is attained by a transformant obtainable by introducing the replicable recombinant DNA into an appropriate host.

The fifth object of the present invention is attained by a process for preparing the protein comprising culturing the transformant in a nutrient culture medium, and collecting the formed protein from the resultant culture.

[Function]

As is described above, the protein according to the present invention has the specific physicochemical properties, and induces the IFN- γ production when acts on immunocompetent cells.

The DNA according to the present invention expresses the production of the present protein by introducing it into an appropriate self-replicable vector to form a recombinant DNA, and introducing the recombinant DNA into a host capable of proliferat-

ing without difficulty but inherently incapable of producing the present protein.

The replicable recombinant DNA according to the present invention expresses the production of the present protein by introducing it into a host capable of proliferating without difficulty but inherently incapable of producing the present protein.

The transformant produces the protein when cultured.

When the transformant is cultured by the process according to the present invention, the present protein is formed in a desired amount with a relative easiness.

Explaining now the present invention with reference to the following experiments and examples, the present invention is based on the finding of a novel protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. During the study on cytokines produced from mammalian cells, the present inventors found the existence of a novel substance which induces the IFN- γ production in mouse liver. They isolated the substance by the combination use of purification methods comprising column chromatography mainly, studied the property and feature and revealing that the reality is a protein having the following physicochemical properties:

(1) Molecular weight

19,000 \pm 5,000 daltons on gel filtration sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(2) Isoelectric point (pI)

4.8 \pm 1.0 on chromatofocusing;

(3) Partial amino acid sequence

Possessing partial amino acid sequences in

SEQ ID Nos.1 and 2; and

(4) Biological activity

Inducing the interferon- γ production by immunocompetent cells.

The experiments conducted to reveal the physicochemical properties are explained in the below:

Experiment 1

Preparation of purified protein

To 600 8-week-old female CD-1 mice was intraperitoneally injected one mg/mouse of dead *Corynebacterium parvum* (ATCC 11827) which had been obtained by preheating at 60°C for one hour, and the mice were fed in usual manner for 7 days and intravenously injected with one μ g/mouse of a purified lipopolysaccharide derived from *Escherichia coli*. On 1-2 hours after the intravenous injection, the mice were sacrificed by dislocating their cervical vertebrae to collect their blood from hearts, followed by removing their livers, disrupting them by a homogenizer in 8-fold volumes of 50 mM phosphate buffer (pH 7.3), and extracting the resultant. The resultant extract was centrifuged at about 8,000 rpm for 20 min, and an about 9 L of the resultant supernatant was admixed with a saturated ammonium sulfate in 50 mM phosphate buffer (pH 7.3) to give a saturation degree of 45 w/v %. The resultant solution was allowed to stand at 4°C for 18 hours and centrifuged at about 8,000 rpm for 30 min to obtain a 19 L supernatant containing the present protein.

The supernatant was fed to a column packed with about 4.6 L of "PHENYL SEPHAROSE", a product of Pharmacia LKB, Uppsala Sweden, which had been equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 7.3) containing one M ammonium sulfate, and the column was washed with a fresh preparation of the same buffer, and fed at an

SV (space velocity) 0.57 with 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) having a linear gradient of ammonium sulfate ranging from 1 M to 0.2 M. Fractions containing the present protein eluted at 0.8 M ammonium sulfate were collected and pooled into an about 4.8 L solution which was then concentrated with a membrane filter, dialyzed against 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) at 4°C for 18 hours, and fed to a column packed with about 250 ml of "DEAE-SEPHAROSE", a product of Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden. The column was washed with a fresh preparation of the same buffer and fed at an SV 0.13 with 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) with a linear gradient of sodium chloride ranging from 0 M to 0.2 M to elute the present protein at a concentration of about 0.13 M sodium chloride.

Fractions containing the present protein were collected, pooled (about 260 ml), concentrated and dialyzed against 25 mM Bis-Tris buffer (pH 7.1) at 4°C for 18 hours. The dialyzed solution was applied to a column packed with about 24 ml of "MONO-P", a product of Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, and eluted with 10 v/v % polybuffer 74 (pH 4.0) while decreasing the pH from 7 to 4 to obtain an about 23 ml eluate containing the present protein. The eluate was concentrated, fed to a column packed with "SUPERDEX 75", a product of Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, which had been equilibrated with a solution containing 7 mM disodium hydrogen phosphate, 3 mM sodium dihydrogen phosphate, and 139 mM sodium chloride, and eluted with a fresh preparation of the same solution on gel filtration chromatography to obtain fractions containing the present protein, eluted at fractions corresponding to about 19,000 daltons. The fractions were pooled and concentrated for use in Experiment 2. The yield of the present protein was about 0.6 µg/mouse.

Experiment 2

Physicochemical property of protein

Experiment 2-1

Molecular weight

In accordance with the method reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol.227, pp.680-685 (1970), the purified protein prepared by the method in Experiment 1 was electrophoresed in a sodium dodecylsulfate (SDS) polyacrylamide gel free of reducing agent to mainly show a single protein band with an IFN- γ inducing activity at a position corresponding to about $19,000 \pm 5,000$ daltons. The marker proteins used in this experiment were calf serum albumin (MW=67,000 daltons), ovalbumin (MW=45,000 daltons), soy bean trypsin inhibitor (MW=20,100 daltons), and α -lactalbumin (MW=14,400 daltons).

Experiment 2-2

Isoelectric point

The purified protein in Experiment 1 was chromatofocused to give an isoelectric point of about 4.8 ± 1.0 .

Experiment 2-3

Partial amino acid sequence

A portion of an aqueous solution containing the purified protein in Experiment 1 was concentrated up to a volume of about 50 μ l which was then admixed with 25 μ l of a solution containing 3 w/v % SDS, 60 v/v % glycerol, and 60 mg/ml dithiothreitol. The resultant mixture was incubated at 50°C for 30 min, positioned on 15 w/v % polyacrylamide gel, and electrophoresed in usual manner. The resultant gel was stained by soaking the gel in a mixture solution of 10 v/v % aqueous acetic acid solution and 50 v/v % aqueous methanol solution containing 0.1 w/v % coomassie brilliant blue R 250, destained by repeatedly washing the gel with a mixture

solution of 12 v/v % aqueous methanol solution and 7 v/v % aqueous acetic acid solution, and washed by soaking it in distilled water for 18 hours. A portion, which was stained with the coomassie brilliant blue and contained the present protein, was cut out of the gel, and lyophilized.

The lyophilized gel was soaked in 0.6 ml aqueous solution consisting of 100 mM sodium hydrogen carbonate containing 2 µg/ml "TPCK TRYPSIN", 0.5 mM calcium chloride, and 0.02 v/v % aqueous Tween 20 solution, followed by the incubation at 37°C for 18 hours to trypsinize the protein. The resultant was centrifuged to obtain a supernatant, while the resultant precipitate was soaked in one ml of one v/v % aqueous trifluoroacetate containing 0.001 v/v % Tween 20, shook for 4 hours at ambient temperature, and centrifuged to obtain a supernatant. The newly formed precipitate was successively treated similarly as above with 70 v/v aqueous trifluoroacetate containing 0.001 v/v Tween 20 and with 50 v/v % aqueous acetonitrile to obtain a supernatant. The resultant supernatant and the supernatant already obtained in the above were pooled and concentrated up to 250 µl, and the concentrate was centrifugally filtered.

The resultant aqueous solution containing peptide fragments was fed to "HPLC ODS-120T", a column for HPLC commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, which had been previously equilibrated with 0.1 v/v aqueous trifluoroacetate, and the column was washed with 0.1 v/v % aqueous trifluoro acetate, and fed with 0.1 v/v % trifluoro acetate at a flow rate of 0.5 ml/min while the concentration of aqueous acetonitrile was increasing from 0 v/v % to 70 v/v % and the concentration of peptide in the eluate was monitoring by a spectrophotometer at wave lengths of 214 nm and 280 nm. Fractions eluted about 75 min

and about 55 min after the initiation of the elution were respectively collected (hereinafter named "peptide fragment A" and "peptide fragment B"). The elution pattern was in FIG. 1.

The peptide fragments A and B were analyzed on "MODEL 473 A", a protein sequencer commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and revealing that they have the amino acid sequences in SEQ ID NOS:1 and 2.

Experiment 2-4

Biological activity

Experiment 2-4(a)

Induction of the IFN- γ production by immunocompetent cell

BDF1 Female mouse spleen, 8-week-old, was extracted and dispersed in serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.4), and the cells were washed with a fresh preparation of the same medium, and soaked in Gei buffer (pH 8.0) to hemolyze. The resultant spleen cells were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum to give a cell density of 1×10^7 cells/ml, fed to a cell-separatory nylon wool column commercialized by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan, and incubated in an incubator at 37°C for an hour under 5 v/v % CO₂ conditions. Thereafter, T-cells were collected from the column by feeding to the column with RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum, and washed with a fresh preparation of the same buffer. The resultant cells were used in the following experiment for IFN- γ induction.

0.15 ml aliquots of a mouse T-cell suspension in RPMI 1640 medium (pH 7.4) with a cell density of 1×10^7 cells/ml were injected into 96-well microplates, and to each well was added a present purified protein, which had been diluted with 0.05 ml RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum

albumin. The cells in the micropipettes were incubated in the presence or in the absence of 0.5 µg/ml concanavalin A in an incubator at 37°C for 24 hours under 5 v/v % CO₂ conditions. From each well 0.1 ml of the culture supernatant was collected and assayed for IFN-γ production level by conventional enzyme immunoassay (EIA). As a control, a sample free of the present purified protein was provided and treated similarly as above. The standard mouse IFN-γ preparation Gg02-901-533, obtained from The National Institutes of Health, USA, was used as an IFN-γ standard in this experiment, and the activity was expressed in terms of international units (IU).

As a result, no significant IFN-γ production was found with the control sample but found with the test sample: The present protein induced about 2-2,000 IU IFN-γ and about 2-200 IU IFN-γ from 1x10⁶ mouse T-cells when the T-cells were respectively incubated with and without 0.02-10 µg/ml of concanavalin A. The results confirm that the present protein has an activity of inducing the IFN-γ induction by immunocompetent cells.

Throughout the present specification, one unit activity of the present protein is defined as an amount of which induces 160 IU IFN-γ production when tested in the presence of concanavalin A.

Experiment 2-4(b)

Augmentation of cytotoxicity of killer cell

Similarly as in Experiment 2-4(a) mouse spleen cells were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.2) containing 100 µg/ml kanamycin, 5x10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol, and 10 v/v % calf serum to give a cell density of 1x10⁷ cells/ml. The cell suspension was mixed with 0, 1, 5 or 10 units/ml of a recombinant human interleukin 2, placed in a 25-ml culture flask, admixed with 0,

0.8, 4, 20 or 100 units/ml of the purified protein, and incubated in an incubator at 37°C for 72 hours under 5 v/v % CO₂ conditions. Thereafter, the resultant cells were washed with a fresh preparation of the same RPMI 1640 medium (pH 7.2), and suspended together with YAC-1 cells (ATCC TIB160), which were previously labeled with radioactive sodium chromate, to give a cell ratio of 20/1 or 40/1 (effective cells/target cells) in a fresh preparation of the same RPMI 1640 medium (pH 7.2). The cell suspension was poured in 96-well microplates and incubated in an incubator at 37°C for 4 hours under 5 v/v % CO₂ conditions, followed by determining the radioactivity of ⁵¹Cr in the resultant supernatant by a γ -ray counter. The results were in Table 1.

The results in Table 1 show that the present protein has an activity of inducing the cytotoxicity of killer cells, and the activity is augmented by interleukin 2.

Table 1

Factor The present protein (unit/ml)	Interleukin 2 (unit/ml)	Cytotoxicity (%)	
		Ratio (Effective cells/Target cells) 40/1	20/1
100	0	48.6	46.0
20	0	35.3	37.5
4	0	33.0	37.7
0.8	0	22.9	14.5
0	0	0.1	0.0
100	1	55.8	55.2
20	1	54.2	46.4
4	1	40.5	26.4

0.8	1	22.1	10.3
0	1	0.4	0.0
100	5	63.6	59.1
20	5	62.2	49.1
4	5	56.2	44.6
0.8	5	38.4	23.4
0	5	1.0	0.2
100	10	67.8	56.5
20	10	67.7	59.9
4	10	62.8	54.1
0.8	10	46.2	31.7
0	10	1.0	0.5

No protein having the above identified physicochemical properties has been known, and this confirms that it is a novel protein. The present inventors isolated mRNA from mouse liver cells, collected a DNA fragment which partially encodes the present protein by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the presence of a primer which was chemically synthesized by using the mRNA as a template based on the partial amino acid sequence revealed in Experiment 2-3, and energetically studied a cDNA library, prepared from the mRNA by using the DNA fragment as a probe, to obtain a DNA fragment in SEQ ID NO:4 which contains the 5'-terminus and consists of 471 base pairs. The decoding of the base sequence revealed that the present protein contains an amino acid sequence in SEQ ID NO:3 which consists of 157 amino acids and contains the N-terminal. In SEQ ID NO:3 the symbol "Xaa" as an amino acid means "Met (methionine)" or "Thr (threonine)".

The sequential techniques used to reveal the amino acid sequence and base sequence in SEQ ID NOS:3 and 4 are summarized in the below.

- (1) The present protein is isolated from mouse liver cells and highly purified by combining conventional purification methods comprising chromatography as a main technique;
- (2) The resultant purified protein was digested with trypsin, and 2 polypeptide fragments were isolated from the resultant mixture and determined for amino acid sequence;
- (3) From mouse liver cells, mRNA was collected, and a DNA fragment which partially encodes the present protein was prepared by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the presence of a primer which was chemically synthesized by using the mRNA as a template based on the partial amino acid sequences revealed in the above. The RNA fragments were screened by using an oligonucleotide as a probe which had been chemically synthesized based on these partial amino acid sequences, followed by collecting a DNA fragment which partially encodes the present protein;
- (4) A cDNA library was prepared with the mRNA as a template and hybridized with the DNA fragment as a probe, followed by collecting a transformant which strongly hybridized with the DNA fragment; and
- (5) A cDNA was isolated from the transformant, and the

base sequence was determined and decoded. The comparison of the decoded amino acid sequence and the partial amino acid sequence revealed that the base sequence encodes the present protein.

The following Experiment 3 is to explain the above techniques (3) to (5), and the techniques in themselves used therein are commonly known in the art, for example, those disclosed by J. Sambrook et al. in "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2nd edition (1989), published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, and by Masami MURAMATSU in "Rabo-Manual for Genetic Technology" (1988), published by Maruzen Co., Ltd., Tokyo, Japan.

Experiment 3

Base sequence of DNA and amino acid sequence of protein

Experiment 3-1

Preparation of whole RNA

Three g of wet mouse liver cells, similarly prepared by the method in Experiment 1, was weighed, sealed in 20 ml of a mixture solution containing 6 M guanidine isothiocyanate, 10 mM sodium citrate, and 0.5 w/v SDS, and disrupted with a homogenizer. 35-ml centrifugation tubes were injected with 25 ml of 0.1 M EDTA (pH 7.5) containing 5.7 M cesium chloride, and 10 ml of the homogenized cells were overlaid on the upper part of the solutions in the tubes, followed by centrifuging the tubes at 25,000 rpm for 20 hours to collect RNA fractions. The fractions were pooled, distributed into 15-ml centrifugation tubes, and mixed with equal volumes of a mixture solution of chloroform and isobutanol (= 4:1 by volume). The tubes were vibrated for 5 min and centrifuged at 4°C and at 10,000 rpm for 10 min, and the formed water layers were

collected, pooled, mixed with 2.5-fold volumes of ethanol, and allowed to stand at -20°C for 2 hours to precipitate the whole RNAs. The precipitate was collected, pooled, washed with 75 v/v % aqueous ethanol solution, and dissolved in 0.5 ml of sterilized distilled-water for use in the following experiment. The yield of the RNAs was about 4 mg. on a dry solid basis (d.s.b.).

Experiment 3-2

Preparation of DNA fragments encoding partially the present protein

One µg of the whole RNAs in Experiment 3-1 was mixed with 4 µl of 25 mM magnesium chloride, 2 µl of a solution of 10xPCR buffer consisting of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) and 500 mM potassium chloride, 8 µl of one mM dNTP mix, one µl of a solution containing one unit/µl RNase inhibitor, one µl of a solution containing 2.5 units/µl reverse transcriptase, and one µl of 2.5 µM random hexamer, and further mixed with sterilized distilled-water to give a total volume of 20 µl. The mixture solution was placed in 0.5 ml reaction tubes, and, in usual manner, successively incubated at 25°C for 10 min, at 42°C for 30 min, at 99°C for 5 min, and at 5°C for 5 min to effect the reverse transcriptase reaction, followed by recovering an aqueous solution containing the first strand cDNA.

To 20 µl of the aqueous solution were added 4 µl of 25 mM magnesium chloride, 8 µl of 10xPCR buffer, 0.5 µl of a solution containing 2.5 units/µl of AmpliTaq DNA polymerase commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and one pmole of primer 1 or 2 as a sense primer or an anti-sense primer. The mixture solution was volumed up to 100 µl with sterilized distilled-water, and, in usual manner, successively incubated at 94°C for one min, at 45°C for 2 min, and at 72°C for 3 min in a

cyclic manner for 40 cycles to amplify a DNA fragment, which partially encodes the present protein, by using the first strand cDNA as a template. The primers 1 and 2 are oligonucleotides, which were chemically synthesized based on the amino acid sequences of Pro-Glu-Asn-Ile-Asp-Asp-Ile and Phe-Glu-Asp-Met-Thr-Asp-Ile in SEQ ID NOS:1 and 2, have base sequences of 5'-ATRTCRTCDATRTTYTCNGG-3' and 5'-TTYGARGAYATGACNGAYA T-3', respectively.

A portion of the resultant PCR product was fractionated on electrophoresis in 2 w/v % agarose gel, transferred onto a nylon film, fixed with 0.4 N sodium hydroxide, washed with 2xSSC, air-dried, soaked in a prehybridization solution containing 5xSSPE, 5xDenhard's solution, 0.5 w/v % SDS and 100 µg/ml of denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. An oligonucleotide as a probe 1 having a base sequence of 5'-TTYGARGARATGGAYCC-3' was synthesized based on the amino acid sequence of Phe-Glu-Glu-Met-Asp-Pro in SEQ ID NO:1, and labeled with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase. The nylon film was soaked in a solution containing one pmole of the probe 1, 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 µg/ml of a denatured salmon sperm DNA, and incubated at 45°C for 24 hours to effect hybridization. The resultant nylon film was washed with 6xSSC and autoradiographed in usual manner and revealing that the PCR product contained the objective DNA fragment.

The remaining PCR product was mixed with "pT7 BLUE T", a plasmid vector commercialized by Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan, an adequate amount of T4 ligase, and further mixed with 100 mM ATP up to give a concentration of one mM, followed by the incubation at 16°C for 18 hours to insert the DNA fragment into the plasmid vector. The recombinant DNA thus obtained was

introduced into *ESCHERICHIA COLI* NOVA Blue strain, a microorganism of the species *Escherichia coli* commercialized by Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, to obtain a transformant which was then inoculated into a medium plate containing 10 g/l bactotryptone, 2.5 g/l sodium chloride, 15g/l bacto-agar, 100 mg/l ampicillin, 40 mg/l X-Gal and 23.8 mg/l isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (hereinafter abbreviated as "IPTG"), and incubated at 37°C for 24 hours to form colonies. A nylon film was in usual manner positioned on a medium plate and allowed to stand for about 30 seconds to attach the colonies thereunto. The nylon film was then detached from the medium plate and soaked for 7 min in a solution containing 0.5 N sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride to effect cell lysis. Thereafter, the nylon film was soaked for 3 min in 1.5 M sodium chloride in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.2), washed with 2xSSC, soaked in 0.4 N sodium hydroxide for 20 min to fix the DNA, washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a prehybridization solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μ g/ml denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. The colonies on the nylon film were in usual manner hybridized with the probe 1, washed with 6xSSC, and autoradiographed similarly as above, followed by selecting from the medium plate transformants which strongly hybridized with the probe 1.

The transformants were inoculated in L-broth (pH 7.2) containing 100 μ g/ml ampicillin and incubated at 37°C for 18 hours, followed by collecting cells from the culture and collecting recombinant DNA by conventional SDS-alkali method. The analysis of the dideoxy method revealed that the recombinant DNA contained a DNA fragment consisting of base sequences which correspond to those at positions from 85 to 281 in SEQ ID NO:4.

Experiment 3-3

Preparation of mRNA

0.05 ml of an aqueous solution containing the whole RNAs in Experiment 3-1 was placed in a test tube, admixed with 0.5 ml of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing one mM EDTA and 0.1 w/v % SDS, and volumed up to one ml with sterilized distilled-water. To the mixture was added one ml "OLIGOTEX-dT30 SUPER", an oligo-d(T)₃₀ latex commercialized by Nippon Roche K.K., Tokyo, Japan, followed by the incubation at 65°C for 5 min to denature the RNAs and the cooling for 3 min in an ice-chilled bath. The resultant mixture was admixed with 0.2 ml of 5 M sodium chloride, incubated at 37°C for 10 min, and centrifuged at 10,000 rpm at 25°C for 10 min. The precipitate in the form of a pellet was suspended in 0.5 ml sterilized distilled-water, and incubated at 65°C for 5 min to extract mRNA from the oligo-d(T)₃₀ latex. The yield of the mRNA was about 5 µg.

Experiment 3-4

Preparation of cDNA library

cDNA Library was prepared from the mRNA in Experiment 3-3 by using "cDNA SYNTHESIZING SYSTEM PLUS", a cDNA cloning kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA. The procedures were as follows: To 1.5-ml reaction tube were successively added 4 µl of a solution for synthesizing the first strand cDNA, one µl sodium pyrophosphate solution, one µl of a solution of human placenta ribonuclease inhibitor, 2 µl deoxynucleotide triphosphate mix, and one µl oligo-dT primer. The resultant mixture was mixed with 2 µl of mRNA in Experiment 3-3, volumed up to 19 µl with sterilized distilled-water, mixed with one µl of a solution containing 20 units of reverse transcriptase, and incubated at 42°C for 40 min

to obtain a reaction mixture containing the first strand cDNA.

The mixture thus obtained was mixed with 37.5 μ l of a solution for synthesizing the second strand cDNA, 0.8 units of ribonuclease H derived from *Escherichia coli*, and 23 units of DNA polymerase, and volumed up to 100 μ l with sterilized distilled-water. The resultant mixture was successively incubated at 12°C for 60 min and at 22°C for 60 min, mixed with 2 units of T4 DNA polymerase, and incubated at 37°C for 10 min to obtain a reaction mixture containing the second strand cDNA. To the reaction mixture was added 4 μ l of 0.25 M EDTA (pH 8.0) to suspend the reaction, and the resultant was in usual manner extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective cDNA, followed by recovering the precipitate.

To the cDNA thus obtained were added 2 μ l of L/K buffer, 250 pmole Eco RI adaptor, and 2.5 units of T4 DNA ligase in this order, and the resultant solution was volumed up to 20 μ l with sterilized distilled-water, and incubated at 15°C for 16 hours to ligate the Eco RI adaptor to the both ends of the cDNA. The reaction mixture was mixed with 2 μ l of 0.25 M EDTA to inactivate the remaining enzyme, and subjected to molecular sieve chromatography to remove intact Eco RI adaptor. To the resultant were added 40 μ l of L/K buffer and 80 units of T4 polynucleotide kinase, and the mixture was volumed up to 400 μ l with sterilized distilled-water, followed by the incubation at 37°C for 30 min to methylate the Eco RI cleavage sites. The resultant mixture was extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective DNA, followed by recovering the DNA. To the DNA were added 1.5 μ l of L/K buffer containing an adequate amount of λ gt 10 arms, and 2.5 units of T4 DNA ligase, and the resultant solution was volumed up to 15 μ l with sterilized

distilled-water, incubated at 15°C for 15 hours to effect ligation, and subjected to conventional *in vitro* packaging method to obtain a phage containing a recombinant λDNA.

Experiment 3-5

Cloning of recombinant DNA

A seed culture of *Escherichia coli* NM514 strain was in usual manner infected with the phage in Experiment 3-4, and the infected cells were inoculated in an agar plate (pH 7.0) containing 10 g/l bactotryptone, 5 g/l Bacto-yeast extract, 10 g/l sodium chloride and 15 g/l bacto-agar, and incubated at 37°C for 6 hours to form plaques. The agar plate was covered with a nylon film and allowed to stand for about 30 seconds to attach the plaques thereunto. The nylon film was detached from the plate, and successively soaked in an aqueous solution containing 0.5 M sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride for 2 min and in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 1.5 M sodium chloride for 5 min. The nylon film was washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. Thereafter, the resultant nylon film was incubated in a solution containing an adequate amount of DNA fragment as a probe 2 obtained in Experiment 3-2 and labeled with ^{32}P by "READY PRIME DNA LABELLING SYSTEM", a DNA labeling kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA, 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 µg/ml of denatured salmon sperm DNA, and the mixture was incubated at 60°C for 20 hours to effect hybridization. The resultant was subjected to autoradiography similarly as above to select phage DNA clones which strongly hybridized with the probe 2.

With conventional techniques, the cDNA were amplified in *Escherichia coli*, followed by the extraction of a recombinant DNA from the cells. The recombinant DNA was cleaved with *Eco* RI, a restriction enzyme. Plasmid vector pUC19 (ATCC 37254) was cleaved with the same restriction enzyme, and the resultant cleaved DNA fragments and plasmid fragments were ligated with DNA ligase to obtain a recombinant DNA which was then introduced into *Escherichia coli* JM109 (ATCC 53323) by conventional competent cell method to obtain a transformant.

Experiment 3-6

Determination of base sequence and amino acid sequence

The transformant in Experiment 3-5 was inoculated into L-broth (pH 7.2) and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The resultant proliferated cells were collected and treated with conventional SDS-alkali method to obtain a recombinant DNA containing the DNA according to the present invention. The analysis on an automatic sequencer using a fluorophotometer revealed that the recombinant DNA contains the base sequence from the 5'-terminus in SEQ ID NO:5. The decoding of the base sequence indicated that it encodes the amino acid sequence containing the N-terminal in SEQ ID NO:5. The amino acid sequence contains the partial amino acid sequences in SEQ ID NOS:1 and 2 corresponding to those at positions from 79 to 103 and from 26 to 43 in SEQ ID NO:5, and this means that the present protein contains the amino acid sequence containing the N-terminal in SEQ ID NO:3, and that it is encoded by a DNA containing the base sequence from the 5'-terminus in SEQ ID NO:4.

As is described above, the present inventors have found the present protein, which induces IFN- γ production by immunocompetent cells, through their long term research. Unlike

conventional proteins, the present protein has specific physicochemical properties. The present invention is to provide the protein by applying the recombinant DNA technology. The present protein and its preparation will be described in detail with reference to the following Examples.

The protein according to the present invention means proteins in general which have specific physicochemical properties and those derived from natural sources, as well as those prepared by the recombinant DNA technology. The present protein generally has a partially or totally revealed amino acid sequence, for example, the amino acid sequence containing the N-terminal in SEQ ID NO:3 and its homologous amino acid sequences. Variants, which have complementary amino acid sequences to the one in SEQ ID NO:3, can be obtained by replacing one or more amino acids in SEQ ID NO:3 with other amino acids without alternating the inherent biological properties of the present protein. Even when used the same DNA and depending on hosts into which the DNA is introduced, as well as on the components and the conditions of cultivation temperature and pH for culturing transformants containing the DNA, it may be formed variants which are defective in or additionally contain one or more amino acids near to the N-terminal in SEQ ID NO:3, but have the inherent biological properties of the protein through the modification by internal enzymes of the hosts after the DNA expression. The present protein includes such variants as long as they induce the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The present protein can be prepared by culturing in nutrient culture media transformants with DNAs encoding the protein, and collecting the formed protein from the resultant cultures. The transformants usable in the present invention can

be obtained by introducing into appropriate hosts DNAs having the base sequence of SEQ ID NO:4, homologous base sequences to it, and complementary ones to these base sequences. One or more bases in those base sequences can be replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence of the present protein. To express the production of the protein in hosts by such DNAs, one or more bases in base sequences which encode the present protein or its variants can be replaced with other bases.

Any DNA can be used in the present invention as long as it has one of those base sequences independently of their origin, i.e. those from natural sources or those prepared by chemical synthesis. The natural sources include, for example, mouse liver cells from which the gene containing the present DNA is obtainable. The preparation procedure is as follows: Remove mouse liver previously challenged with stimulants such as *Corynebacterium parvum*, BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*, mitogen and lipopolysaccharide, disrupt the liver cells, and isolate the whole DNAs from the resultant suspension. Treat the DNAs with oligo-dT cellulose or oligo-dT latex to obtain poly (A)'RNA, and fractionate it using a sucrose density gradient buffer to isolate mRNA. Allow a reverse transcriptase and a polymerase to act on the mRNA as a template to form double-stranded cDNA, introduce the cDNA into an appropriate self-replicable vector, and introduce the resultant recombinant DNA into an appropriate host such as *Escherichia coli*. Culture the resultant transformant in a nutrient culture medium, and collect the proliferated cells containing the DNA encoding the present protein by the colony hybridization method. The DNA according to the present invention is obtainable by treating the transformants with conventional

methods. To artificially produce the present DNA, for example, it is prepared by the chemical synthesis based on the base sequence in SEQ ID NO:4, or by introducing a DNA which encodes the amino acid sequence in SEQ ID NO:3 into an appropriate vector to form a recombinant DNA, introducing the recombinant DNA into an appropriate host, culturing the resultant transformant in a nutrient culture medium, isolating the proliferated cells from the culture, and collecting plasmids containing the objective DNA from the cells.

The DNA was generally introduced into hosts in the form of a recombinant DNA. Such a recombinant DNA usually contains the DNA and a self-replicable vector, and it can be readily prepared by the recombinant DNA technology in general if only the DNA is in hand. Examples of such self-replicable vector are plasmid vectors such as pKK223-2, pGEX-2T, pRL-λ, pBTrp2 DNA, pUB110, YEp13, Ti plasmid, Ri plasmid and pBI121. Among these vectors, pKK223-2, pGEX-2T, pRL-λ, pBTrp2 DNA, pUB110 and YEp13 are suitably used when the present DNA is expressed in prokaryotes such as yeasts and other microorganisms of the species *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, while Ti plasmid, Ri plasmid and pBI121 are suitably used for the expression in animal and plant cells.

To introduce the present DNA into these vectors, conventional methods used in this field can be arbitrarily used: Genes containing the present DNA and self-replicable vectors are cleaved with restriction enzymes and/or ultrasonic, and the resultant DNA fragments and vector fragments are ligated. To cleave genes and vectors, the use of restriction enzymes, which specifically act on nucleotides, more particularly, type I restriction enzymes such as *Sau 3AI*, *Eco RI*, *Hind III*, *Bam HI*, *Sal*

I, *and I, Sac I* and *rsu I*, facilitates the ligation of DNA fragments and vector fragments. To ligate DNA fragments and vector fragments, they are, if necessary, first annealed, then treated with a DNA ligase *in vivo* or *in vitro*. The recombinant

DNAs thus obtained can be readily introduced into appropriate hosts, and this enables the limitless replication of the DNAs by culturing the transformants.

The recombinant DNAs usable in the present invention can be introduced into appropriate hosts such as yeasts and other microorganisms of the species *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: When microorganisms of the species *Escherichia coli* are used as a host, they are cultured in the presence of recombinant DNAs and calcium ions, and the competent cell method and the protoplast method are used when microorganisms of the species *Bacillus subtilis* are used as a host. To clone the objective transformants, they are selected by the colony hybridization method or by culturing all the transformants in nutrient culture media, and selecting those which produce proteins capable of inducing immunocompetent cells to produce IFN- γ .

The transformants thus obtained produce the present protein intracellularly or extracellularly when cultured in nutrient culture media. Examples of such nutrient culture media are those in the form of liquid in general which contain carbon sources, nitrogen sources and minerals, as well as amino acids and/or vitamins as a micronutrient. The carbon sources usable in the present invention include saccharides such as starch, starch hydrolysates, glucose, fructose and sucrose. The nitrogen sources usable in the present invention include nitrogen containing organic- and inorganic-compounds such as ammonia and their salts,

urea, nitrates, peptone, yeast extract, defatted soy bean, corn steep liquor, and beef extract. Transformants are inoculated into nutrient culture media and incubated at a temperature of 25-65°C and at a pH of 2-8 for about 1-10 days under aerobic conditions by the agitation-aeration method, etc., to obtain cultures containing the present protein. Although the cultures can be used intact as an IFN- γ inducer, they are, if necessary, subjected to ultrasonication and/or cell lysis enzymes to disrupt cells, followed by filtering or centrifuging the resultant suspensions to remove intact cells and cell debris, and further purifying the resultant supernatants containing the present protein. The purification methods usable in the present invention are, for example, those which are generally used in this field to purify biologically active substances, i.e. concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectric point electrophoresis, and, if necessary, two or more of them can be used in combination. The resultant purified solutions containing the present protein can be concentrated and/or lyophilized into liquids or solids to meet to final uses.

As is described above, the present protein has an activity of inducing IFN- γ production by immunocompetent cells. Because of this, the present protein can be arbitrarily used as therapeutic and/or prophylactic agents, for example, those for virus diseases such as AIDS and condyloma acuminatum; malignant tumors such as renal cancer, granuloma, mycosis fungoides and cerebral tumor; and immune disorders such as articular rheumatism and allergy.

The present protein is allowed to coexist in nutrient

culture media to induce the IFN- γ production by immunocompetent cells, or directly administered to mammals for the treatment and/or prevention of IFN- γ susceptive diseases. In the former, leukocytes separated from peripheral blood of mammals, or established immunocompetent cells such as HBL-38 cells, MO cells, Jurkat cells, EL-4 cells and L12-R4 cells are suspended in nutrient culture media containing the present protein to induce the IFN- γ production. If necessary, such nutrient culture media can be supplemented with T-cell stimulants such as mitogen, interleukin 2, and anti-CD 3 antibody, and the cells are cultured at 30-40°C and at a pH of about 5-8 for about 1-100 hours while the media were replacing with fresh ones. IFN- γ can be obtained from the resultant cultures by one or more conventional methods in general used for purifying biologically active substances, for example, concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectric point electrophoresis.

To treat and/or prevent IFN- γ susceptive diseases, the present IFN- γ inducing agent is directly administered to mammals: For example, IFN- γ inducing agents are orally administered to mammals after formulated into appropriate forms, or injected to the mammals intradermally, subcutaneously, muscularly, intravenously and peritoneally. The mammals, which can be administered with the present protein, are not restricted to human, and include other animals such as mouse, rat, hamster, rabbit, dog, cat, cow, horse, goat, sheep, pig and monkey. Since the present protein has a strong IFN- γ inducibility and an extremely-low toxicity, it readily induces the IFN- γ production with only a small amount without causing serious side effects even

when administered to in a relatively-large amount. Thus, the present protein advantageously induces the desired amount of IFN- γ production smoothly without strict control of the administration.

The present protein has a feature of strongly augmenting the cytotoxicity of killer cells, and, when used in combination with interleukin 2 and/or tumor necrosis factor (TNF), it exerts a strong effect on the therapeutic effect and/or the reduction of side effects in the treatment of adoptive immunotherapy for malignant tumors including solid carcinomas such as lung cancer, renal cancer and breast cancer.

The preparation of the present protein using the transformants will be explained in detail with reference to the following Examples:

Example 1

Replicable recombinant DNA and transformant

The first strand cDNA was prepared from the whole RNAs in Experiment 3-1 by using "GeneAmp RNA PCR Kit", a PCR kit commercialized by Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan. The procedures were as follows: To a 0.5-ml reaction tube were added 4 μ l of 25 mM magnesium chloride, 2 μ l of 10xPCR buffer, 8 μ l of one mM dNTP mix, one μ l of one unit/ μ l RNase inhibitor, one μ l of 2.5 units/ μ l of reverse transcriptase, one μ l of 2.5 μ M random hexamer, and one μ l of the whole RNAs in Experiment 3-1, and the mixture was volumeed up to 20 μ l with sterilized distilled-water. The resultant mixture was successively incubated at 25°C for 10 min, at 42°C for 30 min, at 99°C for 5 min, and at 5°C for 5 min to obtain a reaction mixture containing the first strand cDNA.

Twenty μ l of the reaction mixture was mixed with 4 μ l of 25 mM magnesium chloride, 8 μ l of 10xPCR buffer, 0.5 μ l of 2.5 units/ μ l of AmpliTaq DNA polymerase, and adequate amounts of sense

primer and anti-sense primer as shown by the base sequences of 5'-CGAGGGATCGAACTTTGGCCGACTTC-3' and 5'-CGAGGAATTCTTAACTTGATGTAAG-3' which were chemically synthesized based on the amino acid sequences near to the N- and C-terminals in SEQ ID NO:3, and the resultant mixture was volumed up to 100 μ l with sterilized distilled-water. The mixture was in usual manner successively incubated at 94°C for one min, at 55°C for 2 min, and at 72°C for 3 min, and the successive incubation was repeated 40 cycles. The resultant PCR product was cleaved with *Bam* HI and *Eco* RI as a restriction enzyme to obtain a *Bam* HI-*Eco* RI DNA fragment.

To an adequate amount of sterilized distilled-water were added 100 ng of the fragment, 10 ng of "pGEX-2T", a plasmid vector commercialized by Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, which had been cleaved with *Bam* HI and *Eco* RI as a restriction enzyme, an adequate amount of T4 DNA ligase, and 10 mM ATP in an amount of which gives the final concentration of one mM, followed by incubating the mixture solution at 16°C for 18 hours. The recombinant DNA thus obtained was introduced into *Escherichia coli* DH5 strain (ATCC 53868) to obtain a transformant which was then inoculated into L-broth (pH 7.2) containing 50 μ g/l of ampicillin, followed by the incubation at 37°C for 18 hours and extracting the objective recombinant DNA by conventional SDS-alkali method.

The recombinant DNA was named "pMGTG-1" and analyzed for structure on the dideoxy chain termination method and revealing that, as is shown in FIG.2, in pMGTG-1, MGTG cDNA which has the base sequence of SEQ ID NO:4 is positioned in the downstream of the Tac promotor and the gene for glutathione S transferase.

Example 2

Preparation of protein by transformant

A transformant obtained by the method in Example 1 was

inoculated in L-Broth (pH 7.2) containing 50 μ g/ml of ampicillin, and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions. One v/v % of the proliferated transformants as a seed was inoculated into 18 L of a fresh preparation of the same medium, and cultured at 37°C under aeration-agitation conditions until the absorbance (A_{650}) of the culture reached to about 0.6, followed by adding IPTG to the culture to give a concentration of one mM. Thereafter, the resultant culture was incubated for 5 hours and centrifuged to separate cells which were then suspended in a mixture solution (pH 7.3) containing 150 mM sodium chloride, 16 mM disodium hydrogen phosphate, and 4 mM sodium dihydrogen phosphate, treated in usual manner with ultrasonication, and centrifuged to remove cell debris to obtain a supernatant.

The supernatant was fed to a column packed with "GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B", a gel commercialized by Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, which had been equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) supplemented with 150 mM sodium chloride, and the column was washed with a fresh preparation of the same buffer and fed with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) supplemented with 5 mM reducing glutathione to elute proteins. Fractions containing proteins were pooled, mixed with calcium chloride to give a concentration of 2.5 mM together with 1,000 units of thrombin, and incubated at 25°C for 18 hours. The reaction mixture was fed to a column packed with "GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B", which had been equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) supplemented with 150 mM sodium chloride, followed by recovering non-adsorbed fractions. Thereafter, the fractions were pooled, concentrated, lyophilized to obtain a solid preparation containing the present protein with a specific activity of about 5×10^5 units/mg protein in a yield of about 3 mg per one L of the culture.

Similarly as in Experiment 2, the purified protein was studied on the physicochemical properties and revealing that it has a molecular weight of $19,000 \pm 5,000$ daltons on gel filtration and SDS-PAGE, and a pI of 4.8 ± 1.0 on chromatofocusing. The testing by the method in Experiment 2-4 revealed that the purified protein effectively induces the IFN- γ production by immunocompetent cells independently of the presence of concanavalin A (Con A), and strongly augments the cytotoxicity of killer cells. This is an evidence that the present protein can be prepared by the recombinant DNA technology.

[Effect of the Invention]

The present invention is based on the finding of a novel protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. The present protein is generally a substance with a partially or totally revealed amino acid sequence which has a stable activity of inducing IFN- γ production by immunocompetent cells. Therefore, the present protein is widely used as an IFN- γ inducer for the IFN- γ production by the cell culture method and as a therapeutic and/or prophylactic agent in general for IFN- γ susceptive diseases such as viral diseases, malignant tumors and immunopathies.

The present protein has a strong IFN- γ inducibility so that it can induce the desired amount of IFN- γ production with only a relatively small amount. The protein dose not cause serious side effects even when administered to in a relatively large amount because of its extremely low toxicity. Therefore, the present protein has an advantage that it promptly induces the desired amount of IFN- γ production without strictly controlling the dose. The present protein has an outstanding activity of increasing the cytotoxicity of killer cells and inducing a strong

activity on the therapeutic effect and/or the reduction of side effects in the treatment of adoptive immunotherapy for malignant tumors including solid carcinomas such as lung cancer, renal cancer and breast cancer.

The present protein with these useful properties can be obtained in a desired amount by using the present DNA encoding the protein.

The present invention is a significant invention that exerts such a remarkable effect and gives a great contribution to this field.

SEQUENCE LISTING

(1) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 25 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal fragment

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile
1 5 10 15
Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys
20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 18 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: internal fragment

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu
1 5 10 15
Pro Gln

(3) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 157 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn
1				5					10				15		
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met
				20				25					30		
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile
				35				40				45			
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser
				50				55			60				
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Xaa	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile
	65			70				75				80			
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser
				85				90				95			
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu
				100				105				110			
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu
				115				120				125			
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	
				130				135			140				
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser			
				145				150			155				

(4) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

 - (A) LENGTH: 471 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

AACTTTGGCC	GACI	TC	CTG	TACAACCGCA	GTAATACGGA	ATATAATGA	CCAAGTTCTC	60
TTCGTTGACA	AAAGACAGCC	TGTGTTGAG	GATATGACTG	A TATTGATCA	AAGTGCCAGT		120	
GAACCCCAGA	CCAGACTGAT	AATATAACATG	TACAAAGACA	GTCAAGTAAG	AGGACTGGCT		180	
GTGACCCTCT	CTGTGAAGGA	TAGTAAAAYG	TCTACCCCTCT	CCTGTAAGAA	CAAGATCATT		240	
TCCTTGACGG	AAATGGATCC	ACCTGAAAAT	ATTGATGATA	TACAAAGTGA	TCTCATATTG		300	
TTTCAGAAAC	GTGTTCCAGG	ACACAACAAG	ATGGAGTTG	AATCTTCACT	GTATGAAGGA		360	
CACTTTCTTG	CTTCCCCAAA	CGAAGATGAT	GCTTCAAAC	TCATTCTGAA	AAAAAAAGGAT		420	
GAAAATGGGG	ATAAAATCTGT	AATGPTICACT	CTCACTAACT	TACATCAAAG	T		471	

(5) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

 - (A) LENGTH: 471 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) strandedness: double
 - (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

 - (A) ANIMAL: mouse

- (ix) FEATURE:

 - (A) NAME/KEY: 1-471 mat peptide

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

AAC	TTT	GGC	CGA	CTT	CAC	TGT	ACA	ACC	GCA	GTA	ATA	CGG	AAT	ATA	AAT	48
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Lys	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn	
1				5				10				15				
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	GTT	GAC	AAA	AGA	CAG	CCT	GTG	TTC	GAG	GAT	ATG	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	
								20				25			30	
ACT	GAT	ATT	GAT	CAA	AGT	GCC	AGT	GAA	CCC	CAG	ACC	AGA	CTG	ATA	ATA	144
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile	
								35			40		45			
TAC	ATG	TAC	AAA	GAC	AGT	GAA	GTA	AGA	GGA	CTG	GCT	GTG	ACC	CTC	TCT	192
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	
								50			55		60			
GTG	AAG	GAT	AGT	AAA	AYG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Xaa	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
								65			70		75		80	
TCC	TTT	GAG	GAA	ATG	GAT	CCA	CCT	GAA	AAT	ATT	GAT	GAT	ATA	CAA	AGT	288
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	
								85			90			95		
GAT	CTC	ATA	TTC	TTT	CAG	AAA	CGT	GTT	CCA	GGA	CAC	AAC	AAG	ATG	GAG	336
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu	
								100			105			110		
TTT	GAA	TCT	TCA	CTG	TAT	GAA	GGA	CAC	TTT	CTT	GCT	TGC	CAA	AAG	GAA	384
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	
								115			120			125		
GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	CTC	ATT	CTG	AAA	AAA	AAG	GAT	GAA	AAT	GGG	GAT	432
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp		
								130			135			140		
AAA	TCT	GTA	ATG	TTC	ACT	CTC	ACT	AAC	TTA	CAT	CAA	AGT				471
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser				
								145			150			155		

[Brief Description of the Accompanying Drawings]

FIG. 1 is an elution pattern on HPLC of peptide fragments obtained by the trypsinization of the present protein.

FIG. 2 is a structure of pMGTG-1, i.e. a recombinant DNA according to the present invention.

[Explanation of the symbols]

MGTG-1 cDNA : cDNA which encodes the present protein

Ptac : tac promoter

GST : glutathione S transferase gene

AmpR : ampicillin resistant gene

ori : replication initiation site of *Escherichia coli*

Absorbance at 214 nm

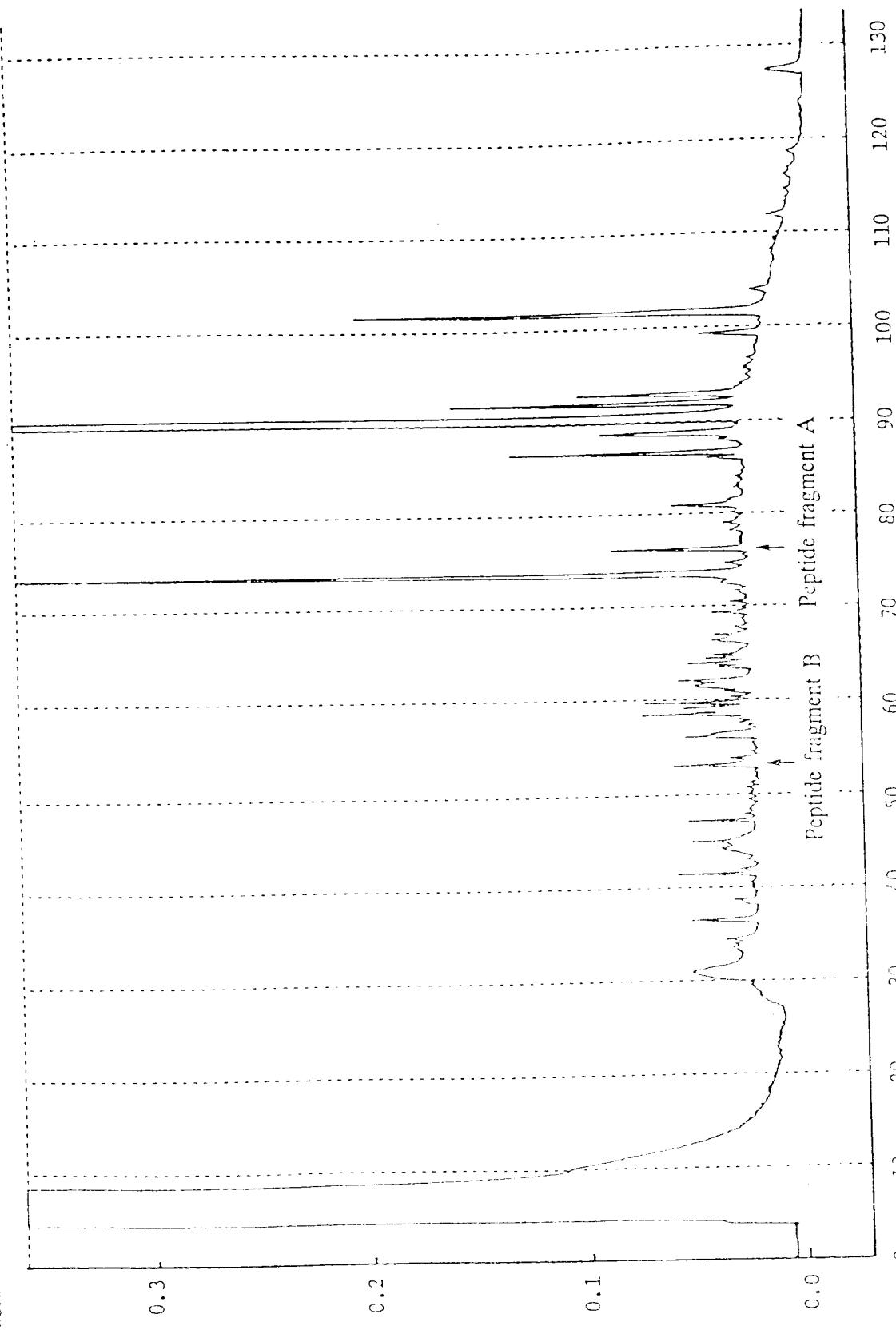


FIG.1
Elution time (min)

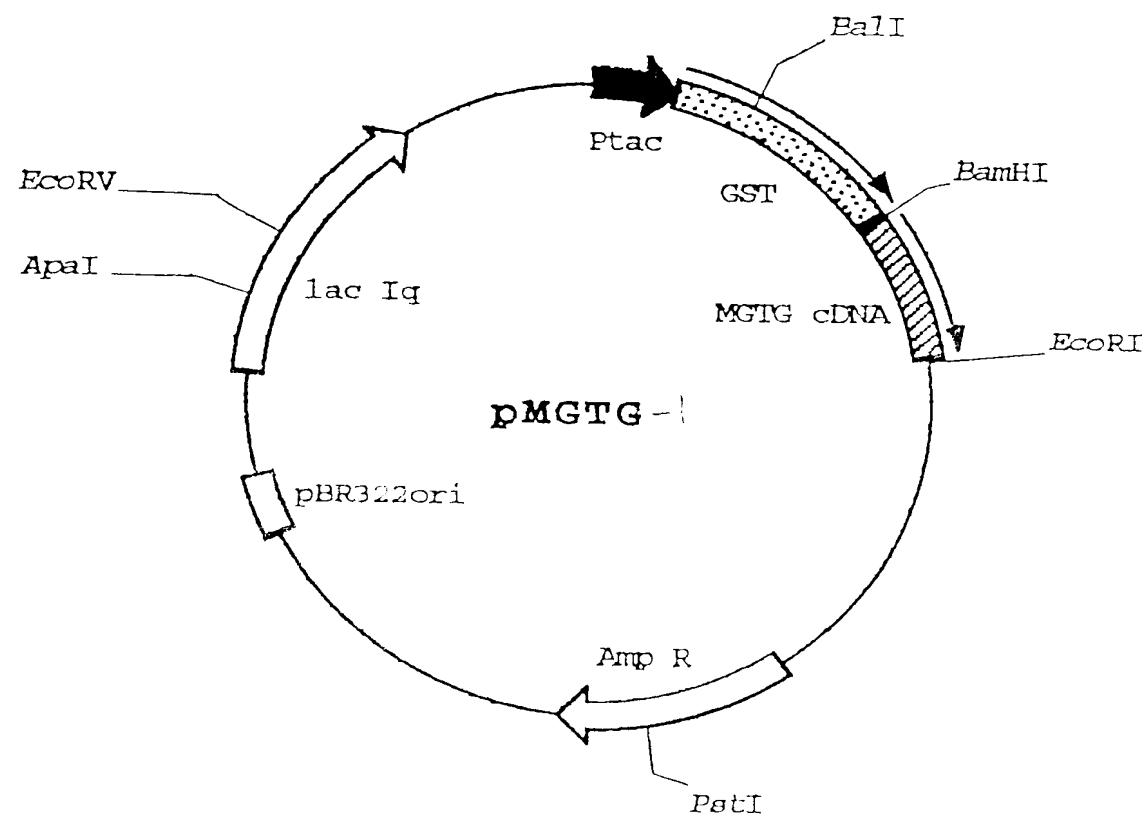


FIG.2